

MAIT-solujen stimulaatio *Escherichia coli* ja *Candida albicans* mikrobeilla

Pro gradu

Simo Miettinen

Bakteriologian ja immunologian osasto

Immunobiologian tutkimusohjelma

Molekulaariset ja integratiiviset biotieteet

Bio- ja ympäristötieteellinen tiedekunta

Helsingin Yliopisto

2018



Tiedekunta/Osasto Fakultet/Sektion – Faculty		Laitos/Institution – Department	
Bio- ja ympäristötieteellinen tiedekunta		Molekulaariset ja integratiiviset biotieteet	
Tekijä/Författare – Author			
Simo Miettinen			
Työn nimi / Arbetets titel – Title			
MAIT-solujen stimulaatio <i>Escherichia coli</i> ja <i>Candida albicans</i> mikrobeilla			
Oppiaine / Läroämne – Subject			
Lääketieteellinen mikrobiologia			
Työn laji/Arbetets art – Level		Aika/Datum – Month and year	Sivumäärä/ Sidoantal – Number of pages
Pro Gradu		02/2018	50 + 4 sivua liitteitä
Tiivistelmä/Referat – Abstract			
<p>Ihmissen immuunijärjestelmä voidaan jakaa kahteen osaan, synnynnäiseen ja oppivaan immunitettiin. Synnynnäinen immuunivaste toimii nopeasti, mutta on epäspesifinen. Oppiva eli adaptiivinen immuunivaste alkaa hitaasti, mutta on erittäin spesifinen. Näiden järjestelmien välillä toimii ryhmä T-soluja, joilla on ominaisuuksia molemmista vasteista. Alun perin vuonna 1993 Porcelli havaitsi T-solujen alapopulaation ihmisen verenkierrasta. Tämä populaatio nimettiin myöhemmin MAIT-soluiksi (Mucosal associated T cells), niiden esiintymispaikan mukaan. MAIT-soluja esiintyy runsaasti ihmisen limakalvoilla, mm. suolistossa ja keuhkoissa. MAIT-solut omaavat ominaisuuksia molemmista immuunijärjestelmistä. MAIT-solut aktivoituvat vain hyvin kapeakirjoisesta valikoimasta ligandeja, jotka esitellään niille erittäin konservoituneesta MR1-molekyylistä. MR1 on MHC I-luokan kaltainen molekyyli, joka ilmenee laajalti eri soluissa. Tärkein ligandi, jota esitellään MR1-molekyylistä, on riboflaviinin esiaste (Vitamiini B:n). Kaikki kasvit ja suuri osa bakteereista ja hiivoista tuottavat riboflaviinia, mutta nisäkkäät eivät. Joten tämä esiaste (5-OP-RU) on selkeä merkki kehon ulkopuolisesta tekijästä.</p> <p>Vuonna 2016 suomalaisesta perheestä löydettiin aiemmin julkaisematon mutataatio <i>IKFZ2</i>-geenissä. Kyseinen geeni koodaa HELIOS-transkriptiotekijää, jonka tiedetään olevan osallisena T-solujen kypsymisessä kateenkorvassa ja myöhemmin sitä havaitaan regulatorisista T-soluista (Treg). Tällä hetkellä tiedetään, että kyseiseltä perheeltä puuttuvat miltei kaikki MAIT-solut sekä verestä, että suolen limakalvoilta. Tutkimukset mutaation vaikutuksista ovat kesken.</p> <p>Tämän tutkielman tarkoituksena oli selvittää, lisääntyykö HELIOS-transkriptiotekijän tuotanto MAIT-soluissa, kun niitä stimuloidaan <i>Escherichia coli</i> –bakteerilla ja <i>Candida albicans</i> –hiivalla. Stimulaation jälkeen MAIT-solut värjättiin vasta-aineilla ja analysoitiin virtausytometrialla. Tutkielma on osa laajempaa projektia, jonka kohteena on <i>IKFZ2</i> mutatio ja sen vaikutukset MAIT-soluihin.</p> <p>Ensimmäinen koe oli eristää kypsymättömät MAIT-solut ihmisen kateenkorvasta, joka oli poistettu avosydänleikkauksessa olleilta lapsilta. Testasin tätä lähestymistapaa useita kertoja, mutta epäkypsät MAIT-solut olivat ilmeisesti liian naiiveja ja poistivat pinnaltaan reseptoreja mikrobistimulaation jälkeen tai menivät jopa apoptoosiin, jonka takia emme nähneet niitä enää virtausytometrianalyyseissä. Kateenkorvan kudoksen käsittelyyn liittyi myös muita teknisiä vaikeuksia.</p> <p>Toinen lähestymistapa oli eristää perifeerisen veren valkosolut aikuisten vapaaehtoisten veriä näytteistä. Tämä lähestymistapa näytti toimivan ja loput kokeet suoritettiin tällä tavalla. Näissä stimuloimissa käytettiin neljää eri vapaaehtoista ja tulokset osoittivat, että <i>C. albicans</i> -stimuloidut MAIT-solut aktivoituivat. Ne tuottivat huomattavasti enemmän interferoni-gammaa, kuin ei-stimuloidut solut ja poistivat pinnaltaan niiden iTCR-molekyylin, joka havaittiin vähentyneenä määränä tarttunutta MR1-tetrameeria. Nämä aktivoidut solut ilmensivät enemmän HELIOS-transkriptiotekijää, kuin stimuloimattomat solut tai bakteereilla stimuloidut solut. Tulokseni osoittavat ensimmäistä kertaa, että HELIOS-transkriptiotekijän osallistuu MAIT-solujen aktivaatioon.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords			
MAIT-solu, T-solu, immunologia, virtausytometria, <i>Candida albicans</i> , <i>Escherichia coli</i>			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited			
Viikin tiedekirjasto			
Ohjaaja – Handledare – Supervisor			
Eliisa Kekäläinen			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information			



Tiedekunta/Osasto Fakultet/Sektion – Faculty Faculty of Biological and Environmental Sciences		Laitos/Institution– Department Molecular and Integrative Biosciences Research Programme	
Tekijä/Författare – Author Simo Miettinen			
Työn nimi / Arbetets titel – Title Stimulation of MAIT cells with the microbes <i>Escherichia coli</i> and <i>Candida albicans</i>			
Oppiaine /Läroämne – Subject Medical microbiology			
Työn laji/Arbetets art – Level Pro Gradu	Aika/Datum – Month and year 02/2018	Sivumäärä/ Sidoantal – Number of pages 50 + 4 sivua liitteitä	
<p>Tiivistelmä/Referat – Abstract</p> <p>Human body is protected by immune system which can be divided into two subsystems, the innate and adaptive immunity. Innate immunity can be characterized by fast, but nonspecific reactions to pathogens. The adaptive immunity on the other hand is accurate, but slow what comes to the reaction time to specific pathogens. A new type of immune cells were discovered in 1993 when Porcelli found out that there is an invariant T-cell population in human blood. These cells were later on named mucosal associated invariant T cells (MAIT), because they were mostly located in the mucosal areas of the human body. MAIT cells resembled characters from both of the immune systems. They act on in a very limited array of ligands presented in evolutionary conserved MR1 molecule. The MR1 is a MHC I like molecule expressed by a vast variety of cells. The main ligand presented in the MR1 is a precursor of riboflavin (Vitamin B). All the plants and most of the bacteria and yeasts produce riboflavin, but mammals do not. So the precursor (5-OP-RU) is a clear sign of non self.</p> <p>In 2016 a Finnish family was discovered to have a previously unpublished mutation in gene <i>IKZF2</i>. This gene expresses HELIOS transcriptionfactor which is known to be part of the T-cell lineage maturation in the thymus and later on found in the regulatory T cells (Treg). When the family was examined it was found out that they lack almost completely MAIT cells.</p> <p>In this study I tested a hypothesis that the HELIOS transcriptorfactor is required to the functional maturation of the MAIT cells. The experiment designed was to stimulate MAIT cells with <i>Escherichia coli</i> bacteria and <i>Candida albicans</i> yeast. The readout was immunostained cells analyzed with flowcytometry.</p> <p>The first experiment was to extract immature MAIT cells from the human thymus, which were removed from children undergoing open cardiac surgery. I tested this approach several times, but the immature MAIT cells were apparently too naïve and internalized reseptors after microbe stimulation or went in to apoptosis. There was also other technical difficulties concerning the thymus.</p> <p>The second approach was to use adult volunteers and extract white blood cells from their blood samples. This approach seemed to work and rest of the experiments were done in this fashion, Four different volunteers were used in the stimulations and the results showed that <i>C.albicans</i> stimulated MAIT cells were activated because they produced significantly more interferon gamma than the unstimulated cells and they internalized their TCR which was detected as a decrease in the iTCR spesific MR1 tetramer staining. These activated cells produced more HELIOS than the unstimulated cells or the cells stimulated with the bacteria. This result is the first time that the HELIOS is shown to be part of the MAIT cell activation.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords MAIT cell, T cell, immunology, flowcytometry, <i>Candida albicans</i> , <i>Eschrichia coli</i> ,			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited Viikki science library			
Ohjaaja – Handedare – Supervisor Eliisa Kekäläinen			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information			

1. JOHDANTO	5
1.1 IMMUUNIJÄRJESTELMÄ LYHYESTI.....	5
1.2 MR1-MOLEKYyli	7
1.3 MAIT-SOLUT	10
1.3.1 MAIT-solujen kehitys	10
1.3.2 MAIT-solujen aktivaatio ja toiminta	13
1.3.3 MAIT-solut kliinisissä taudeissa	15
1.4 HELIOS, IKAROS, AIOLOS.....	16
2. TAUSTAA JA TYÖN TARKOITUS.....	18
3. MATERIAALIT JA MENETELMÄT	19
3.1 EETTISET LUVAT	19
3.2 PERIFEERISEN VEREN MONONUKLEAARISTEN SOLUJEN (PBMC) ERISTYS VERESTÄ	19
3.3 LYMFOSYYTTIEN ERISTYS SUOLEN EPITEELISTÄ	20
3.4 MAIT-SOLUJEN ERISTYS KATEENKORVASTA	20
3.4.1 Magneettihelmirikastus	21
3.5 MIKROBIEN KASVATUS	22
3.6 CFU/ML MÄÄRITYS.....	22
3.7 CELLFIX KIINNITYS.....	22
3.8 PBMC SOLUJEN STIMULAATIO	23
3.9 KATEENKORVAN SOLUJEN STIMULAATIO.....	24
3.10 VIRTAAUSSYTOTOMETRIA.....	24
3.10.1 Vasta-aineet.....	25
3.10.2 Solujen värjäys ja permeabilisaatio	26
3.11 KONTROLLIT.....	27
3.11.1 Kompensaatiot.....	27
3.11.2 FMO	28
3.11.3 Isotyyppi kontrolli	28
3.11.4 MR1-molekyylin esto soluviljelmässä	29
3.12 FLOWJO ANALYYSIOHJELMA JA RAJAUSTEN SUUNNITTELU	29
4. TULOKSET	31
4.1 CFU/ML TULOKSET	31
4.2 FMO JA ISOTYYPPIKONTROLI	31
4.3 MAGNEETTIRIKASTUS.....	32
4.4 DUODENUMIN MAIT-SOLUT.....	34
4.5 STIMULAATIOT	36
5. TULOSTEN YHTEENVETO JA JATKOKOKEET.....	41
6. POHDINTA.....	43
7. KIITOKSET.....	45
LÄHTEET.....	46
LIIITTEET	51

Lyhenneluettelo

ALL	Akuutti lymfaattinen leukemia
ATL	Akuutti T-solu lymfooma
APC	Antigeenia esittelevä solu (antigen presenting cell)
CD	CD proteiinit (Cluster of differentiation)
CFU	Pesäkkeitä muodostava yksikkö (colony forming unit)
FCS	Naudan sikiön seerumi (Fetal calf serum)
FSC-A	Suorasironnan kanava – Alue (Forward scatter)
FSC-H	Suorasironnan kanava - Korkeus
IL	Interleukiini
LLT1	Lektiinin kaltainen transkripti 1 (Lectin-like transkript 1)
MAIT	Mucosal associated invariant T-cell
MFI	Fluoresenssin intensiteetin keskiarvo (Mean Fluoresence intensity)
MHC	Kudostyyppiantigeeni (Major histocompatibility complex)
PBMC	Periferaalisen veren valkosolut (Peripheral blood mononuclear cell)
PBS	Fosfaattipuskuroitu keittosuolaliuos (Phosphate buffered saline)
PLZF	Promyelosyyttinen leukemia sinkkisormi (promyelocytic leukemia zinc finger)
PMA	forbolimiraattiasetaatti (Phorbol myristate acetate)
SSC-A	Pienen kulman sironta – Alue (Side scatter)
SSC-H	Pienen kulman sironta - Korkeus
TCR	T-solureseptori (T-cell receptor)
TNF	Tuumorinekroositekijä (Tumor necrose factor)
RPM	Kierrokset minuutissa (rounds per minute)
RT	Huoneenlämpö (room temperature)

1. Johdanto

1.1 Immuunijärjestelmä lyhyesti

Ihmisen puolustusjärjestelmä hyökkää monia erilaisia ulkoisia taudinaiheuttajia vastaan. Tämä järjestelmä voidaan jakaa kahteen osaan, luontaiseen eli synnynnäiseen immunitettiin ja adaptiiviseen eli oppivaan immunitettiin. Synnynnäisen järjestelmän piirteinä ovat nopea vaste ja epäspesifisyys. Oppiva järjestelmä on hitaampi, mutta tarkempi ja se kykenee muistamaan aiemmat kohtaamiset tietyn taudinaiheuttajan kanssa.

Luonnollinen immuunijärjestelmä sisältää anatomisia, fysiologisia ja kemiallisia esteitä. Näiden lisäksi siihen kuuluu luontaisia immuunisoluja monien patogeenien rakenteiden tunnistamiseen. Näin saadaan epäspesifisiä, mutta nopeita reaktioita taudinaiheuttajia vastaan. Hankittu immuunijärjestelmä perustuu sitä vastoin erikoistuneisiin soluihin, jotka tunnistavat mikrobien patogeenisia rakenteita, antigeeneja. Tällaiset solut, joilla on tietty antigeenispesifisyys, ovat suhteellisen harvinaisia verenkierrossa. Tämän takia niiden täytyy monistua antigeenien kohtaamisen jälkeen tehokkaiden vasteiden aikaansaamiseksi. Siksi hankitut immuunivasteet, vaikkakin ovat hyvin spesifisiä, kestävät pidempään kehittyä (Murphy, ym. 2012, Dias 2017)

Hankitun immuunijärjestelmän toiminnan täytyy täyttää neljä sääntöä. 1.) Tunnistus 2.) Efektoritoiminnot 3.) Sääteily ja 4.) Muisti. (Murphy, ym. 2012) Näillä tarkoitetaan kykyä tunnistaa ja erottaa vieraat rakenteet omista. Kykyä toimia tehokkaasti kohdatessaan vieraita antigeenejä, kykyä säädellä omaa toimintaansa erilaisissa tilanteissa ja kykyä muistaa kohtaamansa antigeenit.

Klassisilla (tai tavanomaisilla) T-soluilla on keskeinen rooli adaptiivisessa immunitetissa. Ne ilmentävät $\alpha\beta$ -T-solureseptoreita (TCR, T cell reseptor), jotka tunnistavat peptidiantigeenejä kudostyyppiantigeenimolekyyleissä (MHC, Major histocompatibility complex; ihmisessä HLA-järjestelmä, Human leucocyte antigen), joita esitellään antigeenejä esittelevien solujen (APC-solujen, Antigen presenting cell) pinnalla. Tavanomaiset T-solut jaetaan kahteen ryhmään: auttaja-T-soluihin, jotka ilmentävät pinnallaan ko-reseptori CD4:a ja tappaja-T-soluihin, jotka ilmentävät ko-reseptori CD8:a (Murphy, ym. 2012).

Naiivit eli T-solut, jotka eivät ole vielä kohdaneet antigeeniaan, tarvitsevat aktivaatioonsa APC-solun HLA-molekyylissä esittelemään sopivan antigeenin, jonka ne tunnistavat TCR:llä. TCR-välitteisen aktivaation lisäksi vaaditaan aktivoituneen APC-solun antama ko-stimulatorinen signaali. APC-solujen tuottamat sytokiinit ovat myös keskeisiä aktivaatiossa. APC-solun toiminta on äärimmäisen tärkeää aktivaation suuntauksessa (Murphy, ym. 2012).

Infektoituessa esimerkiksi viruksella elimistön solut kykenevät esittelemään viruksen antigeeneja MHC-I luokan molekyylissä pinnallaan. Aktivoituneet tappaja-T-solut kykenevät tunnistamaan tämän vieraan antigeenin ja tuhoamaan infektoituneen solun ohjaamalla solun apoptoosiin (Murphy, ym. 2012).

Aktivoituneet CD4-positiiviset auttaja-T-solut puolestaan ohjaavat ja aktivoivat muuta immuunivastetta tuottamalla sytokiineja. Yleensä sille esitellään vieras antigeeni APC-solun pinnalla olevalla MHC-II luokan molekyylissä (Murphy, ym. 2012).

Ihmisen TCR-repertuaari muodostuu, kun T-solut kypsyvät kateenkorvassa. Kypsymisen keskeinen osa on toimivan TCR:n rakentaminen. TCR:n ketjuja koodaavat geenit muodostuvat kateenkorvan kypsymisvaiheiden aikana useasta eri geenisegmentistä somaattisen rekombinaation kautta. Tämä takaa miltei rajattoman määrän vaihtelua T-solureseptoreiden antigeenia tunnistavassa osassa. TCR rakentuu kahdesta polypeptidiketjusta, jotka ovat liittyneet toisiinsa rikkisilloin. Suurin osa reseptoreista muodostuu α ja β -ketjuista, mutta pienessä osassa T-soluja on myös $\gamma\delta$ -muotoisia TCR-ketjuja (Murphy, ym. 2012).

Nopean ja laajan luontaisen immuunijärjestelmän ja hitaamman, mutta erittäin spesifisen adaptiivisen immuunijärjestelmän välillä on ryhmä T-soluja, joilla on sekä luontaisia, että adaptiivisia ominaisuuksia. Näitä soluja kutsutaan epätyypillisiksi tai luontaisen kaltaisiksi T-soluiksi. Tyypillistä näille soluille on kyky reagoida nopeasti, vaikka niille ei olisi aiemmin esitelty tiettyä patogeeniä. Toinen tyypillinen piirre on rajoittunut TCR:n vaihtelevuus solutyypin sisällä (Invariant TCR, **iTCR**). TCR ei siis esiinny näissä soluissa vaihtelevana, vaan se tunnistaa aina samoja, tiettyjä ligandeja (Murphy, ym. 2012).

Vuonna 1993 löydettiin T-solupopulaatio, joka myöhemmissä tutkimuksissa todettiin omaavan molempien immuunijärjestelmän osien ominaisuuksia. Myöhemmin havaittiin, että näitä soluja esiintyy runsaasti limakalvoilla ja esiintymispaikan mukaan niitä alettiin kutsua MAIT -soluiksi (**M**ucosal **a**ssociated **i**nvariant **T** cell). Niitä esiintyy ihmiselimistössä erityisesti limakalvoilla, verenkierrossa ja maksassa. Ne tunnistavat mikrobien riboflaviinisynteesin välituotteita, jotka esitellään niille MR1-molekyylissä. MAIT-solujen kehitystä ja toimintaa on pystytty selvittämään tarkemmin vasta viime vuosina ja ne ovatkin aktiivisen tutkimuksen kohteita (Ghazarian ym. 2017)

Epätyypillisiin T-soluihin luetaan MAIT-solujen lisäksi luonnolliset tappajasolut (NKT), $\gamma\delta$ -T-solut, CD-1 rajoittuneet T-solut (Murphy, ym. 2012)

1.2 MR1-molekyylä

Normaalisti APC-solun esitellessä peptidejä T-soluille, tapahtuu se MHC-molekyylin kautta. Lipidit ja glykolipidit taas esitellään MHC-1b-molekyylissä. Vuonna 1995 Japanilainen tutkijaryhmä havaitsi ihmisen genomista MHC-molekyylin kaltaisen geenin, MR1, MHC-alueen ulkopuolella kromosomissa 1q25 (Hashimoto ym. 1995).

Tämän geenin huomattiin olevan hyvin säilynyt evoluutiossa ja sillä sen sekvenssi on n. 90 % samankaltainen hiiren geenin kanssa (Riegert 1998). Proteiinisekvenssissäkään ei ole runsaasti eroa tähän mennessä tutkittujen nisäkäslajien kesken. Proteiinisekvenssin homologia vaihtelee 84 % - 100 % välillä (Taulukko 1.)

Taulukko 1. Valittujen nisäkäslajien MR1 – molekyylin $\alpha 1$ ja $\alpha 2$ domeenien proteiinisekvenssin samankaltaisuus verrattuna ihmiseen (Huang, ym. 2009).

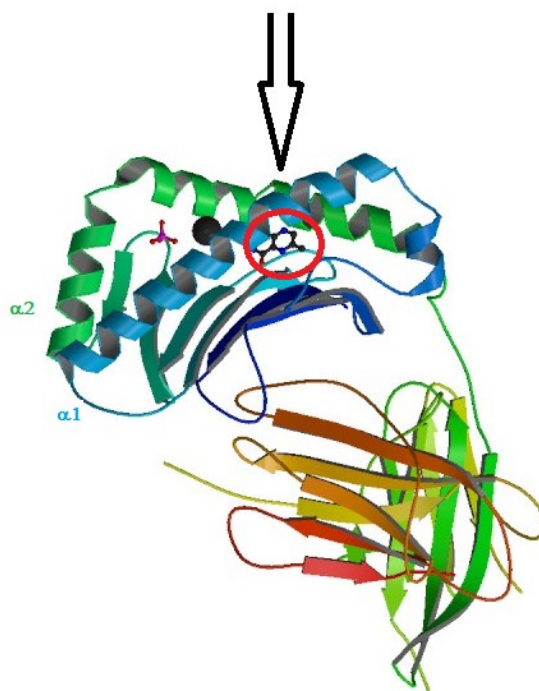
	Hiiri (<i>Mus musculus</i>)	Rotta (<i>Rattus norvegicus</i>)	Nauta (<i>Bos taurus</i>)	Simpanssi (<i>Pan troglodytes</i>)	Oranki (<i>Pongo abelii</i>)	Apina (<i>Macaca mulatta</i>)
Ihminen (<i>Homo sapiens</i>)	89 %	87 %	84 %	100 %	98 %	94 %

Vasta myöhemmissä tutkimuksissa saatiin selville mitä MR1 esittelee. Tutkimus on ollut haastavaa, sillä MR1:n ligandit ovat epästabiileja. Kyseessä olevat molekyylit ovat välituotteita riboflaviinisynteesissä: 5- (2-oksoetyleenidiamino) -6-D-ribityylaminourasiili (5-OE-RU) ja 5- (2-oksopropylideeniamino) -6-D-ribityyliaminouracil (5-AU-RU, lumatsyyllisyntaasin substraatti). Muitakin ligandeja on löydetty. Foolihapon osa, 6-formyylipteriini (6-FP) esitellään MR1-molekyylissä, mutta aktivaation sijaan se suppressoi MAIT-soluja. On esitetty, että suppressoivat ja aktivoivat ligandit kilpailevat keskenään MAIT-solujen aktivaatiossa. Mikrobi-infektion alkaessa riboflaviinimetabolian tuotteet lisääntyvät suhteessa ravinnon foolihappoligandeihin, näin ollen mahdollistaen MAIT-solujen aktivaation. (Lars Kjer-Nielsen ym. 2012).

MR1 molekyylä voi esiintyä kaikissa ihmisen soluissa (Riegert ym. 1998), mutta yleensä se on solun sisällä stabiilissa tilassa ja ilmentyy solukalvolle vasta saadessaan oikean ligandin. Tällä hetkellä ajatellaan ligandin kytkeytyvän MR1-molekyyliin endosomin sisällä, mutta varmuutta asiasta ei vielä ole. Tiedetään, että MR1 ei ole täysin laskostunut, kun se on solun sisällä ja vasta ligandin tarttuminen saa sen laskostumaan lopulliseen muotoonsa ja ilmentymään solukalvolle (McWilliam ym. 2017).

MR1-molekyylissä on ura, jonka pohjalle ligandi tarttuu kovalenttisen sidoksen avulla muodostaen Schiffin emäksen (Kjer-Nielsen 2012). Tämä sidos auttaa stabiloimaan epävakaan molekyylin, jolloin sen esitleminen on mahdollista (Kuva 1.).

Viime aikoina on tehty tutkimuksia, joissa on havaittu tiettyjen lääkeaineiden sopivan MR1-molekyyliin. Vuonna 2017 Keller ym. tekivät MR1-molekyylin sitomiskokeita virtuaalisesti *in silico*, käyttäen laajoja molekyylitietokantoja. Aluksi he etsivät sopivia lääkemolekyylejä, jotka voisivat tarttua MR1:en ja seuraavaksi testasivat *in vitro* näitä molekyylikandidaatteja. Esiin nousi useita eri lääkeaineita ja niiden osia, jotka reagoivat MR1-molekyylin kanssa ja osa pystyi jopa aktivoimaan tai inhiboimaan MAIT-soluja. Mielenkiintoisimmat aineet, jotka nousivat esiin, olivat diklofenaakki ja salisyylihappo. Kokeissa salisyylihappo aiheutti erittäin voimakkaan MR1 ylössäätelyn, mutta ei aktivoinut MAIT-soluja, kun taas diklofenaakki aiheutti voimakkaan MAIT-solujen aktivaation, mutta ei MR1-molekyylin ylössäätelyä. Useat eri lääkeaineet, jotka aikaansaivat jommankumman reaktion tässä tutkimuksessa, omaavat riskin aiheuttaa vaihtelevia farmakologisia vasteita tai yliherkkyyssreaktiota. Tarkkaa syytä näihin ei tiedetä. Näyttäisi siis siltä, että MR1-MAIT-solu akseli saattaa olla taustalla osasta lääkeaineyliherkkyyksiä (Keller ym. 2017) .



Kuva 1. MR1-molekyylin rakennekuva. Ligandin sitoutumispaikka on ympyröity punaisella alfaheliksin 1 ja 2 välissä. Kuva muokattu kuvasta 4GUP, rcsb.org. Julkaisuvapaa. (Kjer-Nielsen 2012).

Riboflaviinia tuottavat kasvit, bakteerit ja sienet (Bacher ym. 2000). Tähän mennessä on useita eri bakteerilajeja testattu MAIT-solujen aktivoijina MR1-välitteisesti. Näihin kuuluvat muun muassa suvut *Escherichia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Mycobacteria* ja *Salmonella*. Hiivoista tätä on testattu vasta *Candida* ja *Saccharomyces* –sukujen lajeilla. Mikrobien, joilla ei ole kykyä tuottaa riboflaviinia, kuten *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus*-ryhmä A ja *Listeria monocytogenes*, eivät aktivoi MAIT-soluja. (Guihot ym. 2010, Gold ym. 2010, Lars Kjer-Nielsen ym. 2012).

Nisäkkäät eivät tuota riboflaviinia itse, joten jo pienetkin määrät ovat merkityksellisiä ja voivat tarttua MR1-molekyylin. Onkin esitetty, että MAIT-solut voivat aktivoitua MR1-molekyylin esitellessä niille solukalvojen läpi tihkuvia ligandeja ja näin ne voisivat reagoida myös kauempana oleviin infektoihin (Lars Kjer-Nielsen ym. 2012).

Jos otetaan huomioon MR1 ja MAIT-solujen välinen konservoituneisuus nisäkkäissä, voidaan perustellusti sanoa, että riboflaviinin välituotteiden toimiminen ligandeina on immunologinen mekanismi omien ja ei-omien rakenteiden välisessä tunnistuksessa (Patel ym. 2013).

1.3 MAIT-solut

Alun perin vuonna 1993 tunnistetut MAIT- solut ovat T-solujen alapopulaatio, jotka ilmentävät epätyypillistä T-solureseptoria (iTCR) (Porcelli ym. 1993). Reseptori tunnistaa riboflaviinin biosynteesissä tarvittavan esiasteen, joka esitellään niille evoluutiivisesti säilyneellä MHC-I luokan kaltaisella (MR1) proteiinilla. Riboflaviinia ja sen metaboliitteja tuottavat useat eri bakteerit, hiivat ja kasvit. Bakteerit, jotka eivät tuota riboflaviinia itse, kuten *Listeria* –suvun bakteerit ja useat *Streptococcus* –lajit, eivät suoraan aktivoi MAIT-soluja. Niiden aiheuttama laajempi immuunivaste voi kyllä aktivoida MAIT-soluja, mutta se tapahtuu tällöin epäsuorasti, sytokiinien välityksellä.

Vuonna 2009 Martin ym. (Martin ym. 2009) kehittivät monoklonaalisen vasta-aineen, joka tunnisti ihmisen TCR:stä V α 7.2 osan. Tutkijat havaitsivat, että V α 7.2 positiivisilla soluilla oli runsaasti CD161-pintaproteiinia (Killer cell lectin-like receptor subfamily B, member 1) solukalvolla. Asia tarkentui vuonna 2011, kun Le Bourhis ym. (Le Bourhis ym. 2011) totesi MAIT-solujen ilmentävän samaan aikaan sekä CD161-reseptoria että IL-18 reseptori α :aa (IL-18R α). Näiden tutkimusten jälkeen syntyi yleinen konsensus siitä, että T-solupopulaatiossa ne solut, jotka ilmentävät V α 7.2 ja CD161 ja/tai IL-18R α ovat MAIT-soluja.

MAIT-solujen osuus ihmisen verenkierron T-soluista on 1 - 10 %. Niitä esiintyy myös ruuansulatusjärjestelmässä (1 – 8 %), runsaammin keuhkoissa ja vaginassa (10 – 20 %) ja erityisesti maksassa, jossa niiden osuus T-soluista voi olla jopa noin puolet (Treiner ym. 2003, Dusseaux ym. 2011). MAIT-soluja esiintyy monissa muissakin nisäkäslajeissa, kuten hiirissä, joissa niiden osuus on kuitenkin kymmenesosa ihmisen MAIT-soluista (Koya, ym. 2016).

1.3.1 MAIT-solujen kehitys

Tavalliset T-solut kehittyvät positiivisen ja negatiivisen valinnan kautta kateenkorvassa. Naiivien T-solujen pitää tunnistaa heikosti oman kehon peptidi, joka esitellään MHC I- tai II-luokan molekyylissä. Tämä positiivinen selektio takaa kehityksen jatkumisen. Myöhemmin negatiivisessa selektiossa, liian voimakkaasti oman kehon peptidiin reagoivat T-solut kuolevat. Tästä seuraa sentraalinen toleranssi omia rakenteita kohtaan, vaikkakin selektion tavasta johtuen kaikki T-solut ovat lievästi autoreaktiivisia (Murphy, ym. 2012).

MAIT-solujen kehitys voidaan jakaa kolmeen vaiheeseen, joista kaksi ensimmäistä tapahtuu kateenkorvassa ja viimeinen sen ulkopuolella. Ensimmäisessä vaiheessa solujen reseptoriprofiili on $CD161^{-}$, $CD27^{-}$ ja $CD4^{+}, CD8^{+}, CD45RA^{+}$. Ne eivät vielä ilmennä tyypillistä $CD161$ -reseptoria ja ovat tuplapositiivisia $CD4:n$ ja $CD8:n$ suhteen. Toisessa vaiheessa reseptoriprofiili muuttuu $CD161^{-}$, $CD27^{+}$, $CD45RA^{+}$ ja $CD4^{+}, CD8^{+}$, tai $CD4^{-}, CD8^{+}$. Ne alkavat ilmentää $CD27$ -reseptoria, jota pidetään yhtenä merkinä immuunijärjestelmässä tapahtuvasta tarkistuksesta oikein toimiville soluille. Tässä vaiheessa, kehittyvässä solupopulaatiossa näkyy jo $CD4$ negatiivisia $CD8^{+}$ soluja, joista suurin osa kypsistä MAIT-soluista koostuu (Koay, ym. 2016).

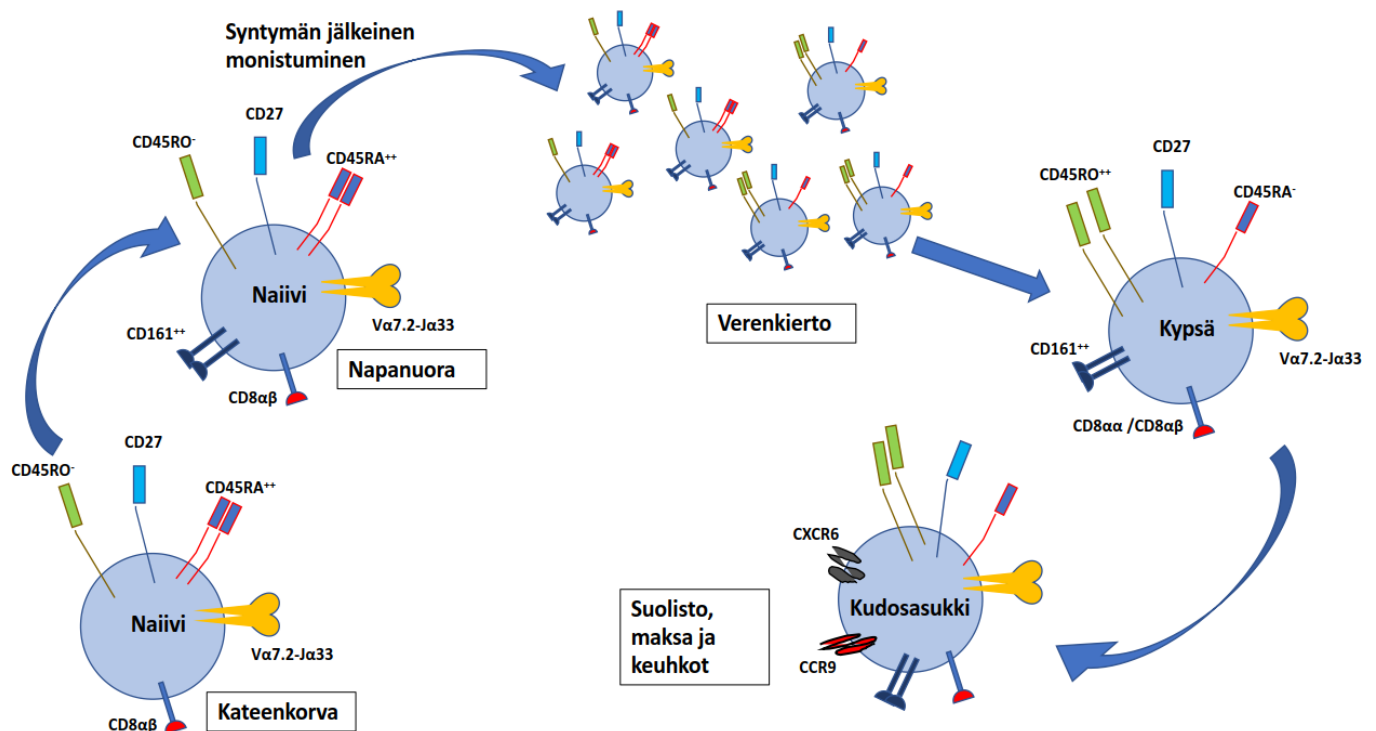
Viimeisessä eli kolmannessa vaiheessa, solut ovat jo kypsyneet pitkälle ja niiden immunologinen fenotyyppi on muotoa: $CD161^{+}$, $CD27^{+}$, $CD45RO^{+}$ ja $CD4^{-}, CD8^{-}$ tai $CD8^{+}$ (Kuva 2). Periferiassa ne muistuttavat muistisoluja, mutta niiden toiminta on hyvin erilaista kuin klassisten $\alpha\beta$ -T-muistisolujen (Koay ym. 2016).

Toisin kuin tavallisilla T-soluilla, MAIT-soluilla kypsymistä ohjaa kaikissa vaiheissa MHC I-luokan kaltainen MR1-molekyyli (Koay ym. 2016). Kateenkorvassa ligandien esittelyn tekevät tuplapositiiviset ($CD4^{+}$, $CD8^{+}$) lymfosyytit (Seach ym. 2013). Tavallisilla T-soluilla esittelyn tekevät siihen erikoistuneet epiteeli- ja dendriittisolut (Murphy, ym. 2012).

Ihmisillä MAIT-solujen negatiivisen selektion järjestelmää tai mekanismeja, joilla niiden voimakas proliferaatio perifeerisessä veressä tapahtuu, ei vielä tarkasti tunneta. Keskeisin ero tavallisiin T-soluihin on se, että MAIT-solut lähtevät kateenkorvasta kesken kypsymisensä ja kehittyvät lopulliseen muotoonsa vasta perifeerisessä verenkierron (Martin ym. 2009)

MAIT-soluilta löytyy PLZF-transkriptiotekijä (Promyelosyyttinen leukemia sinkkisormi), joka yhdistetään NKT-soluihin. NKT-soluilla se on osana ohjaamassa niiden kypsymistä kateenkorvassa, mutta MAIT-soluilla sitä ei vielä havaita kateenkorvavaiheissa. Epäilläänkin, että MAIT-soluilla PLZF vaikuttaa vasta perifeerisessä verenkierron ja osallistuu MAIT-solujen lopulliseen kypsymiseen liittyvään voimakkaaseen solujakautumisvaiheeseen (Martin ym. 2009, Koay ym. 2016). Klassiset T-solut eivät ilmennä PLZF-transkriptiotekijää (Koay ym. 2016).

Kypsä MAIT-solu pintareseptoriprofiili muistuttaa muistisolua ja ne ovatkin jatkuvassa aktivaatiovalmiudessa. Kypsien MAIT-solujen pinnalla olevat CXCR6- ja CCR9-reseptorit ohjaavat ne kudoksiin, erityisesti suolistoon ja maksaan. Niiltä puuttuu CCR7, joka ohjaa muita T-soluja imusolmukkeisiin (Dusseaux ym. 2011).



Kuva 2. MAIT-solujen kypsyminen. Muokattu kuvasta Ghazarian ym. (CC-BY, version 4.0) (Ghazarian ym. 2017).

Kateenkorvassa MAIT-solujen määrä on hyvin alhainen, niiden määrä kuitenkin lisääntyy rajusti, kun ne pääsevät perifeeriseen verenkiertoon (Kuva 2). Mikrobivapaiden hiiren kateenkorvista voidaan havaita ensimmäisen vaiheen MAIT-soluja, mutta verenkierrosta ei löydy lainkaan kolmannen vaiheen soluja. Tämä viittaa vahvasti siihen, että MAIT-solut vaativat normaaliflooran kypsyäkseen normaalisti. Tätä vahvistaa myös tutkimukset, joissa näitä hiiriä on kolonisoitu yksittäisellä bakteerikannalla, jonka jälkeen verenkierrosta on jälleen löytynyt kypsiä MAIT-soluja. (Ghazarian ym. 2017).

Normaaliflooran lisäksi lopullisessa kypsymisessä vaaditaan jollain tapaa B-soluja. Tutkimuksessa vuodelta 2009 tehtiin kokeita B-soluvapaila hiirillä. Näillä hiirillä oli hyvin vähän, jos ollenkaan MAIT-soluja verenkierrassa, vaikka niiden esiasteita havaittiin kateenkorvassa. Kun hiiriin siirrettiin B-soluja, niiden kypsien MAIT-solujen määrät lisääntyivät. Se, mikä B-solujen tarkka rooli tässä lisääntymisessä on, on jäänyt vielä epäselväksi. Epäillään, että ne voivat ohjata MAIT-solut suolistoon kohtaamaan normaaliflooraa, auttaa jakautumisessa tai parantaa niiden elossa säilymistä (Martin ym. 2009).

Toisin sanoen, MAIT-soluilla on hyvin eri tavoin säädelty kehittyminen, kuin tavallisilla T-soluilla. Niiden kehitys kateenkorvassa on vielä suurin osin tuntematonta, mutta tiedetään, että kypsyminen omaksi linjakseen vaatii B-solujen ja normaaliflooran mikrobien yhteisvaikutusta.

1.3.2 MAIT-solujen aktivaatio ja toiminta

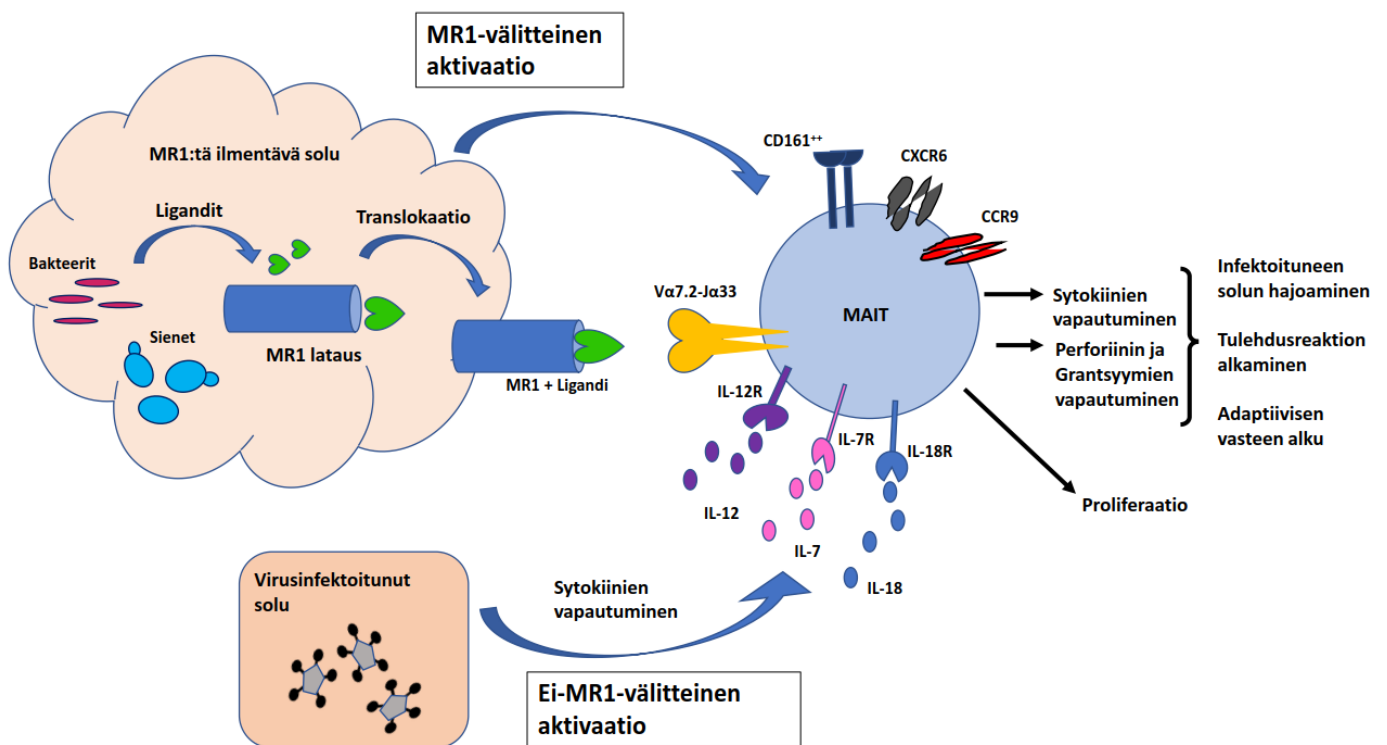
1.3.2.1 MR1 -välitteinen aktivaatio

Kun MAIT-solulle esitellään sopiva antigeeni MR1-molekyylin kautta, se alkaa erittämään sytokiineja mm. IFN- γ , TNF- α ja IL-17, IL-2 ja joskus myös IL-22 (Kuva 3) Sytokiinien lisäksi ne erittävät solukalvoja tuhoavia entsyymejä, kuten gransyymi B:tä ja perforiinia (Dusseaux ym. 2011). MR1-molekyyliin oleva ligandi tarttuu MAIT-solun TCR-molekyyliin ja aiheuttaa aluksi pääasiassa perforiinin erityksen. MR1-välitteisesti aktivoitunut MAIT-solu kykenee tappamaan infektoituneita epiteelisoluja entsyymien, kuten gransyymi B:n ja perforiinin avulla (Le Bourhis ym. 2013).

On esitetty, että laajempaan sytokiinituotantoon vaaditaan lisäksi CD161. Näin ollen MAIT-solujen MR1-aktivaatio olisi ensilinjan tapahtuma, jolla hillitään bakteeri-infektio mahdollisimman pienelle alueelle. CD161-reseptorin ligandi on ihmisillä Lectin Like Transcript 1 (LLT1), joka ilmentyy APC-solujen pinnalla. Näin MAIT-solujen sytokiinien erityks alkaisi tehokkaasti vasta, kun se kohtaa APC-solun MR1-molekyylin yhdessä LLT1-molekyylin kanssa. Tämä johtaisi laajempaan sytokiinien eritykseen mahdollistaen voimakkaamman immuunivasteen (Le Bourhis ym. 2013) pidemmälle levinneessä infektiassa. Tiedetään, että sieni-infektioissa auttaja-T-solut (CD4⁺) ja tappaja-T-solut (CD8⁺) erittävät IFN- γ :a ja IL-17:a (Kumaresan ym. 2018). Onkin mahdollista, että MAIT-solut ovat aktiivisia osallistujia myös sieni-infektioiden torjunnassa bakteereiden ohella.

1.3.2.2 Ei-MR1 - välitteinen aktivaatio

MAIT-solut aktivoituvat myös ilman MR1-molekyyliä, jos ne saavat ympäristöstään riittävästi sopivia sytokiinisignaaleja (Kuva 3.). Vuonna 2014 Ussher ym. tekemässä tutkimuksessa todistettiin tämä ei-MR1-välitteinen aktivaatio. Jo aiemmin oli todettu, että MAIT-solujen pinnalla oli runsaasti IL-18R α reseptoria, jopa enemmän kuin muilla CD8⁺ soluilla (Billerbeck 2010). Tiedetään, että yhdessä IL-12 ja IL-18 sytokiinit aktivoivat NK- ja T-solut tuottamaan IFN- γ . Ussher ym. testasi aktivaatioreittiä estämällä MR1-reitin anti-MR1 vasta-aineella ja stimuloimalla MAIT-soluja kyseisillä sytokiineilla. Tulokset osoittivat aktivaation tapahtuvan ja IFN- γ tuotannon lisääntyvän huomattavasti (Ussher ym. 2014).



Kuva 3. MAIT-solun aktivaatioreitit. MR1-välitteinen aktivaatio tapahtuu iTCR:n kautta ja Ei-MR1-välitteinen tapahtuu sytokiinin välityksellä. Muokattu kuvasta Ghazarian ym. (CC-BY, version 4.0) (Ghazarian ym. 2017).

1.3.3 MAIT-solut kliinisissä taudeissa

MAIT-solujen roolia eri tautitiloissa on tutkittu tähän mennessä jonkin verran. Tiedetään, että ne osallistuvat bakteereiden aiheuttamien infektioiden torjuntaan. Tutkimukset ovat pääasiassa olleet MAIT-solujen määrän mittaamista eri taudeissa. Tähän mennessä tutkimukset ovat pääasiassa keskittyneet niihin kehon osiin, joista MAIT-soluja on jo ennestään löydetty. Tuberkuloosia sairastavilla potilailla MAIT-solujen määrä on vähentynyt verenkierrossa, mutta lisääntynyt keuhkoissa ja askitesnesteessä. Näyttäisi siltä, että MAIT-solut kulkeutuvat verenkierrosta infektiotalueille (Guihot ym. 2010). Hiirikokeilla on osoitettu MAIT-solujen lisääntyvän keuhkoissa, kun hiiriä on altistettu *Salmonella enterica* -bakteerin aerosolille. MR1-puutteiset hiiret altistuivat ja sairastuivat helpommin *K. pneumonia*-bakteerille, kuin normaalista MR1:tä ekspressoivat hiiret. Normaaleilta hiiriltä infektio rajautui inokulointi kohtaan peritoneaalitilaan, eikä levinnyt keuhkoihin asti (Georgel ym. 2011). Toisessa hiirityössä vuodelta 2015 Sakala ym. osoitti *Mycobacterium tuberculosis*-mykobakteereilla infektioituneiden hiirien MAIT-solujen kerääntyvän aktiivisesti keuhkoihin (Sakala ym. 2015).

Kystistä fibroosia sairastavilla ihmisillä on MAIT-solujen määrä verenkierrossa vähentynyt. Ne potilaat, jotka sairastuivat taudinkuvaan tyypillisesti kuuluvaan *P.aeruginosa*-bakteerin aiheuttamaan pneumoniaan, MAIT-solujen määrä laski entisestään. Lasku oli verrannollinen pahentuneeseen keuhkotautiin. Epäillään, että MAIT-solut rikastuivat keuhkoihin, mutta varmuutta asiasta ihmisen kohdalla ei vielä ole (Smith ym. 2014).

Ruuansulatuskanavan taudeissa MAIT-soluja on tutkittu ainakin *Helicobacter pylori*-, *Vibrio cholerae*- ja *Shigella dysenteriae*-bakteereiden kohdalla. Tutkimuksessa vuodelta 2015 Booth ym. osoitti MAIT-solujen kykenevän tappamaan *H.pylori*-infektioituneita makrofageja. MAIT-solut erittivät myös Th1 ja Th17-tyyppisiä sytokiineja. Myös *H.pylori*-infektiosta kärsivien ihmisten MAIT-solut olivat vähentyneet verenkierrossa (Booth ym. 2015). Lapsia koskeneen tutkimuksen mukaan *V. cholerae*-infektio aikaan sai samankaltaisen MAIT-solujen vähenemisen kuten muissa tutkimuksissa (Leung ym. 2014). *Shigella dysenteriae*-rokotteella oli myös samanlainen vaikutus aikuisiin vapaaehtoihin verrattuna plasebo-rokotteen saaneisiin (Le Bourhis ym. 2013).

Edelliset tutkimukset osoittavat MR1-MAIT toiminnan olevan osana bakteeri-infektioiden varhaisessa torjunnassa.

1.4 HELIOS, IKAROS, AIOLOS

IKAROS-transkriptiotekijä, jota koodaa geeni *IKZF1*, kuvattiin 90-luvulla. Hieman myöhemmin tunnistettiin neljä muuta samankaltaista transkriptiotekijää, joita IKAROS-transkriptiotekijän lisäksi ovat HELIOS, AIOLOS, EOS ja PEGASUS, joiden vastaavat geenit ovat *IKZF2-5* (Geurgopolous, et al. 1994)

IKAROS-perheen jäsenet ovat Krüppel-tyyppisiä sinkkisormiproteiineja, joilla on kaksi erittäin konservoitunutta sinkkisormi domeenia N - ja C -terminuksissa. Nämä konservoituneet alueet tarttuvat spesifisiin alueisiin DNA:ssa ja niiden toiminta onkin korvaamatonta lymfosyyttien erilaistumisessa. Ne toimivat T - ja B -solujen transkription aktivaattoreina tai suppressoreina, riippuen kehityslinjasta ja ajankohdasta (Heizmann ym. 2017).

IKAROS-perheen jäsenet tuottavat runsaasti erilaisia isoformeja ja ”splice variant”:ja, jotka tarttuvat itseensä ja toisiinsa muodostaen homo - ja heterodimeerejä keskenään (Kelley ym. 1998). IKAROS liittyy vahvasti lymfosyyttien erilaistumiseen. Jos sen ilmentyminen kanta-soluissa estyy, johtaa se suurentuneeseen B-soluleukemioiden riskiin. Ikaroksella on siis merkittävä rooli syöpäsuppressoreina lymfosyyttien voimakkaan proliferaation aikana (Yoshida, ym. 2014)

HELIOS:ta tuotetaan monissa soluissa, mutta se on tyypillinen transkriptiotekijä T-solulinjassa. Tunnetuin solupopulaatio on regulatoriset T-solut (Treg), jotka omaavat kaikki korkean HELIOS - tason ja sen onkin ajateltu olevan Treg-soluille spesifinen tekijä (Kim, ym. 2015). Alun perin HELIOS -tekijän ajateltiin olevan transkriptiotekijä, joka erottaa kateenkorvasta tulleet Treg -solut perifeerisessä veressä aktivoituneista Treg-soluista (Thornton, ym. 2010). Tämän lisäksi sen on ajateltu estävän Treg - soluja tuottamasta tulehdusta voimistavia sytokiineja hiljentämällä *IL-2* - geenin (Kim ym. 2015).

Tiedetään, että aikuisten T-solu leukemissa (ATL) *IKZF2*-geenissä esiintyy sisäisiä deleetioita. Mutaatiot aiheuttavat geenin luennassa eksonien puutteen ja tuottavat lyhyitä isoformeja HELIOS-transkriptiotekijästä. Nämä lyhyet isoformit muodostavat IKAROS- ja HELIOS-proteiinien välille heterodimeerejä, jotka voivat estää niiden toiminnan. Tästä seuraa voimakasta T-solujen kasvua *in vitro* ja T-solulymfoomia elimistössä (Zhao ym. 2016, Asanuma ym. 2013). Tutkimus vuodelta 2013 osoitti, että muun muassa Ikaroksen deleetiot ja mutaatiot ovat osallisena lasten akuuteissa lymfoblastisissa leukemioissa (ALL). Erityisesti IKAROS-transkriptiotekijän huomattiin olevan

mukana huonon ennusteen B-solu ALL:ssa (Asai ym. 2013). Eri lymfosyyttikehityksen vaiheissa IKAROS-transkriptiotekijän ylituotannolla, tai tekijän puuttumisella kokonaan on merkittävä rooli leukemioiden syntymisessä, joten onkin perusteltua sanoa *IKFZ1*:n olevan onkogeeni.

Gibbs ym. vuodelta 2016 tutki MAIT-soluja naisten genitaalikanavasta ja heidän havainnoissaan osalla naisista oli HELIOS-transskriptiotekijä noussut MAIT-soluissa endometrium alueella, mutta ei cerviksin alueella tai veressä. Samat solut stimuloitiin *E.coli*-bakteerilla ja näissä soluissa nähtiin IL-17 erityksen nousu selvempänä kuin vastaavalla tavalla stimuloituissa veren soluissa (Gibbs ym. 2017). Se, vaikuttaako HELIOS IL-17 nousuun, jää tutkimuksessa kuitenkin epäselväksi, sillä tutkimusteknistä syistä Gibbsin ryhmä joutui yhdistämään endometrium ja cerviksin solut keskenään ennen aktivaatiota. Normaalisti IL-17 yhdistetään sieni-infektioiden aiheuttamaan immuunivasteeseen (Hernández-Santos & Gaffen 2012).

2. Taustaa ja työn tarkoitus

Tämän tutkimuksen kohteena olivat MAIT-solut ja niissä esiintyvä HELIOS-transkriptiotekijä, joka kuuluu IKAROS-transkriptioperheeseen. Tätä kyseistä transkriptiotekijää ei ole vielä perusteellisesti tutkittu, mutta sen tiedetään osallistuvan T-solujen transkription aktivaatioon ja supressioon (Akimova ym. 2011). Työhypoteesina oli, että HELIOS -transkriptiotekijää tarvitaan MAIT-solujen funktionaaliseen kypsymiseen.

Tarkoituksena oli tutkia HELIOS-transkriptiotekijän roolia MAIT-solujen funktionaalisessa kypsymisessä kahdella eri koeasetelmalla. Ensimmäisenä oli tarkoitus eristää lapsilta poistetuista kateenkorvista epäkypsiä soluja, jotka rikastettaisiin PE-konjugoidulla V α 7.2-vasta-aineella käyttäen anti-PE-magneettihelmiä. Lisäksi eristettiin saman lapsen laskimoverinäytteestä PBMC-solut. Näiden PBMC-solujen monosyyttejä inkuboitiiin aluksi mikrobien kanssa. Tämä siksi, että kateenkorvasta rikastettujen solujen joukossa ei ollut APC-soluja, jotka olisivat voineet esitellä mikrobiligandeja MAIT-soluille. Lopulta stimulaation jälkeen solut värjättiin ja HELIOS-taso mitattiin virtaussytometrillä. Toinen vaihtoehto oli eristää PBMC-soluja suoraan vapaaehtoisten aikuisten verestä ja stimuloida niitä samalla tavalla. Tällöin MAIT-solut olivat kuitenkin jo kypsempiä.

Valitsimme koeorganismeiksi *E.coli* - bakteerin ja *C. albicans* – hiivan, sillä molemmat omaavat riboflaviinin biosynteesireitin ja molemmilla oli jo aiemmissa tutkimuksissa saatu positiivisia tuloksia (Le Bourhis ym. 2013). Myöhemmin tutkimuksen edetessä otimme mukaan vielä toisen *E.coli* – kannan, DH5 α , jolla oli tavoitteena saada vahvempi aktivaatiosignaali aikaiseksi, kuin ensimmäisellä kannalla (Le Bourhis ym. 2013). Positiivisena kontrollina oli PMA/ionomysiini, jonka tiedetään aktivoivan T-soluja voimakkaasti (Sander ym. 1991).

Tämä työ liittyy laajempaan tutkimukseen, jossa tutkimuksen kohteena on suomalaisesta perheestä löytynyt *IKZF2*-geenin mutaatio ja sen vaikutukset T-soluihin. Epäillään, että mutaation johdosta MAIT-solut eivät kypsy täydellisesti ja näin ollen niiden määrä jää hyvin vähäiseksi kehossa. Tämä on johtanut perheen jäsenten kohdalla toistuviin bakteeri-, virus- ja hiivainfektioihin heikentyneen immuunipuolustuksen takia. Näistä potilaista tiedettiin, että heidän ohutsuolienbiopsioissa oli äärimmäisen vähän, tai ei ollenkaan MAIT-soluja, joten päätimme tarkistaa elinluovuttajilta saaduista ohutsuoli- ja verinäytteistä, kuinka paljon MAIT-soluja ihmisten näytteissä tavallisesti on.

3. Materiaalit ja menetelmät

3.1 Eettiset luvat

Tämä työ on tehty noudattaen Helsingin julistusta, sekä seuraavilla eettisillä luvilla, jotka on hyväksytty Helsingin- ja Uudenmaan sairaanhoitopiirin operatiivisessa toimikunnassa (Ihmiskudokset: HUS/2566/2016) ja Lasten- ja nuorten sairauksien ja psykiatrian eettisessä toimikunnassa (Kateenkorva: 267/E7/2004, verinäytteet: 380/E/03). Vapaaehtoiset verinäytteen luovuttajat ovat olleet täysi-ikäisiä ja antaneet kirjallisen suostumuksen tutkimukseen.

3.2 Perifeerisen veren mononukleaaristen solujen (PBMC) eristys verestä

Verinäytteet otettiin 10 ml hepariiniputkiin vakuuminäytteenottotekniikalla vapaaehtoisten ihmisten (4 kpl) kyynärtaive laskimosta (Taulukko 2). Veri kaadettiin 50 ml koeputkeen ja laimennettiin 20ml:lla fosfaattipuskuroitua keittosuolaliuosta (Phosphate buffered saline, PBS). Toiseen 50 ml koeputkeen kaadettiin 15 ml Ficoll-Paque+ (GE Healthcare) tiheysgradienttireagenssia. Tämän jälkeen laimennettu veri kaadettiin Ficollin päälle erittäin varovasti, niin etteivät eri faasit sekoittuisi. Koeputki sentrifugoitiin 30 min, RT, 1500 rpm, ilman jarrua tai kiihdytystä (Eppendorf centrifuge 5804 R, roottori A-4-44). Sentrifugoinnin jälkeen koeputkesta imettiin varovasti pipetillä vaalean sävyinen valkosolukerros (Buffy coat) Ficoll- ja plasmakerrosten rajapinnasta. Valkosolut pipetoitiin toiseen koeputkeen, johon lisättiin PBS:a, kunnes kokonaistilavuus oli 50 ml. Valkosolut pestiin PBS:ssä kaksi kertaa sentrifugoimalla 10 min, 1200 rpm, +4 C°, maksimi jarrulla ja kiihdytyksellä. Sentrifugoinnin jälkeen supernatantti kaadettiin pois ja korvattiin puhtaalla, jonka jälkeen sentrifugointi toistettiin. Lopuksi valkosolut laskettiin Bürkerin-kammiolla.

Taulukko 2. Verinäytteiden ja luovuttajien ikä ja sukupuoli eri stimulaatioissa.

Stimulaatio	Luovuttaja
1	♀ 1980
2	♀ 1987
3	♀ 1989
4	♀ 1994

3.3 Lymfosyyttien eristys suolen epiteelistä

Elinsiirtoluovuttajilta saatiin kappale pohjukaissuolta (duodenumia), jonka sisäpuolelta leikattiin noin 10 kpl, ohuita (2 mm x 1,5 cm) suikaleita. Suikaleet siirrettiin 50 ml koeputkeen, jossa oli 5ml RPMI (Roswell park memorial institute) 1640 ravinneliuosta, johon oli lisätty 75 µl 1 M Hepes:iä. Kudospalat pilkottiin saksilla putkessa mahdollisimman pieniksi. Putkeen lisättiin 250 µl kollagenaasi II- ja 125 µl DNase I -entsyymejä. Tämän jälkeen putkeen lisättiin magneettitabletti ja sitä inkuboitiin magneettisekoittajalla 30 minuuttia +37 C° lämpötilassa. Entsyymireaktiot lopetettiin kaatamalla putki täyteen kylmää PBS:ää, jossa oli 10% naudan sikiön seerumia (FCS, Fetal calf serum). Tämän jälkeen putki pidettiin hetki jäällä. Seos suodatettiin ensin metallisella siivilällä, jonka jälkeen se suodatettiin uudelleen 100µm suodattimella 50 ml koeputkeen. Solut pestiin kuten yllä kuvattiin. Supernatantti poistettiin varovasti, sillä putken pohjalla oleva lima liikkuu helposti nestettä kaataessa. Solut resuspensoitiin 1 ml:aan värjäyspuskuria ja laskettiin Bürkerin-kammiolla.

3.4 MAIT-solujen eristys kateenkorvasta

Sydänkirurgiaa tarvitsevien lasten leikkauksessa jää osa kateenkorvaa ylimääräiseksi kudokseksi leikkausteknisistä syistä. Saimme näitä kateenkorvia Helsingin Lastenlinikalta. Kateenkorva laitettiin 5ml petrimaljaan ja päälle kaadettiin PBS:ää. Kudoksesta irrotettiin soluja rapsuttamalla sitä 18G neuloilla, joista toinen oli hieman taitettu päästä. Kun liuoksessa oli runsaasti soluja (näkyi samentumana), pipetoitiin se 50 ml koeputkeen 100 µm suodattimen läpi ja uusi PBS kaadettiin petrimaljaan. Tämä toistettiin 3 – 5 kertaa riippuen kateenkorvan koosta, lopulta solut pipetoitiin ensin 100 µm suodattimen ja sen jälkeen 40 µm suodattimen läpi. Solut pestiin sentrifugoimalla kuten yllä. Lopuksi solut resuspensoitiin 1 ml PBS:ää ja laskettiin Bürkerin-kammiolla.

3.4.1 Magneettihelmirikastus

MAIT-solujen rikastukseen käytettiin MACS® magneettihelmirikastusta. Menetelmässä mielenkiinnon kohteena olevat solut värjätään halutulla vasta-aineella, johon konjugoitu helmiä vastaava fluorokromi. Superparamagneettiset helmet (MACS MicroBeads) sisältävät rautaoksidinanopartikkeleita ja ovat pinnoitettu fluorokromiin sitoutuvalla vasta-aineella. Näin ollen helmet tarttuvat solun pinnalla olevaan fluorokromiin. Kun solut ja niihin tarttuneet helmet siirretään kolumniin, joka on magneettikentässä, jäävät ne kentän vaikutuksesta paikoilleen. Tällä menetelmällä voidaan rikastaa joko positiivinen (värjätyt) tai negatiivinen (kolumnista ulos valuvat) osuus soluista.

Kateenkorvasta irrotetut solut värjättiin 1:20 laimennoksessa värjäyspuskuria PE-fluorokromi konjugoidulla Va7.2 vasta-aineella 30 min ajan, +4 C° lämpötilassa ja pimeässä. Solut pestiin 1 ml:lla PBS:ää, jonka jälkeen ne sentrifugoitiin 10 min, 1200 rpm, +4 C° lämpötilassa, maksimi jarrulla ja kiihdytyksellä. Supernatantti poistettiin ja tämän jälkeen solut resuspensoitiin 160 µl MACS-puskuriin (Liite 1), sekoitettiin 40 µl helmien kanssa (Anti-PE Microbeads UltraPure, Miltenyi Biotec) ja annettiin sitoutua helmiin 15 minuutin ajan, +4 C° lämpötilassa pimeässä. Solut pestiin kuten aiemmin (Kpl 3.2) ja resuspensoitiin 500 µl MACS-puskuriin. LS Kolumnit (Miltenyi Biotec) liitettiin Quadro MACS (Miltenyi Biotec) magneettinseparaattoriin ja esipestiin 3 ml MACS-puskurilla ennen solujen lisäämistä. Solu-helmiseos lisättiin kolumniin ja annettiin valua läpi, tämän jälkeen kolumni pestiin kolme kertaa 3 ml:a MACS-puskuria. Lopuksi kolumni siirrettiin tyhjään koeputkeen ja pestiin 5ml:lla MACS-puskuria, jolloin solu-helmi-kompleksit irtosivat kolumnista puskurin.

3.5 Mikrobiein kasvatus

Escherichia coli ja DH5 α kasvatettiin 100 ml:ssa Luria-lientä (Liite 1), heiluttajassa, jonka kierrokset olivat 220 rpm ja lämpötila +37 C°, n. 24h ajan. Tavoitteena oli myöhäinen latenssivaihe. Seuraavana päivänä solut kerättiin sentrifugoimalla 1500 rpm, 20 min, +4 C°, ilman jarrua. Saatu supernatantti sekoitettiin pakastusliuokseen (50 % glyserolia ja 50 % FCS).

Hiiva, *Candida albicans*, kasvatettiin myös Luria-liemessä ja jatkokäsiteltiin kuten *E.coli*.

Bakteerit kasvatettiin LB-maljalla (Luria broth, liite 1), (olosuhteissa +37 C° ja 5 % CO₂). Hiiva kasvatettiin SG-maljalla (Saboraudin glukoosi) (Liite 1), jotta voitiin välttää mahdolliselta bakteerikontaminaatiolta ennen Luria-liemikasvatusta. Maljoilla kasvatettiin myös CFU laimennokset. Kaikki työvaiheet tehtiin noudattamalla aseptista työskentelyä laminaarivirtauskaapissa.

3.6 CFU/ml määrittäys.

Pakastetusta mikrobista tehtiin laimennossarja 1:10 – 1:1x10⁻¹⁴. Tästä laimennossarjasta pipetoitiin 100 μ l maljalle. Maljoja kasvatattiin yön yli (olosuhteissa +37 C° ja 5 % CO₂). Maljoilta laskettiin seuraavana päivänä pesäkkeet ja määritettiin CFU/ml – arvo käyttäen kaavaa:

$$\text{Pesäkkeidenmäärä} \div \text{Laimennoskerroin} \times \text{Maljalaimennos} = \text{CFU} / \text{ml}$$

3.7 CellFIX kiinnitys

Pakastetuista mikrobeista laskettiin 5x10⁸ CFU määrä. Mikrobit pestiin 1 ml PBS:llä sentrifugoimalla 3 min, 5000g, +4° C. Supernatantti pipetoitiin pois ja pelletti sekoitettiin 500 μ l yksinkertaiseksi laimennuttua CellFIX – liuosta (BD Biosciences). Liuoksen annettiin vaikuttaa 5 – 10 min riippuen mikrobista. Inkubaation aluksi *E.coli* näytettä vorteksoitiin 60 s ja uudestaan inkubaation lopussa 30 s. Tämän jälkeen näyte pestiin kolme kertaa PBS:llä ja sekoitettiin lopuksi 500 μ l humaanikasvatusliuosta (Liite 1). *C.albicans* – hiivan kohdalla ei näytettä vorteksoitu ja pesukertoja oli vain kaksi. Tämä siksi, että suurempikokoinen hiivasolu saattaisi hajota tai kärsiä

rankemmassa käsittelyssä. Kiinnityksen teho tarkistettiin pipetoimalla 100 µl *E.coli* – bakteerin ja *C. albicans* - hiivan humaanikasvatusseosta Luriamaljalle (olosuhteissa +37 C°, ja 5 % CO₂) ja SG-maljalle (olosuhteissa +31 C° ja 1 % CO₂). Kasvua tarkasteltiin seuraavana päivänä. CellFIX – kiinnityksen tarkoitus oli estää mikrobien ylikasvu soluviljelmässä stimulaation aikana.

3.8 PBMC solujen stimulaatio

Eristetyt PBMC-solut siirrettiin 96-kuoppalevyn kuoppiin niin, että 200 µl tilavuudessa kasvatusliuosta oli 1x10⁶ solua (5x10⁶ solua /ml). Soluja säilytettiin soluviljelykaapissa, (olosuhteissa +37 C°, 5 % CO₂), sillä välin kun mikrobeja valmisteltiin CellFIX kiinnityksellä. Kiinnitettyjä bakteereita vorteksoitiin uudelleen 1 min voimakkaasti, hiivoja ei vorteksoitu. Mikrobeja pipetoitiin kuoppiin 10 µl (paitsi DH5α, jota pipetoitiin viimeisessä stimulaatiossa 12 µl, liite 5). Tilavuus säädettiin tarvittaessa humaanimedialla. Kokeissa oli eri määrä mikrobeja, vaihdellen 1 - 6 x10⁶ CFU. Lisäyksen jälkeen kuopat sekoitettiin hyvin pipetoimalla ja inkuboitiin yhden tunnin ajan +37 C° lämpötilassa. Tämän jälkeen lisättiin 1 µl anti-CD28 vasta-ainetta (Anti human CD28, Immunotools, 21270280) mikrobi-PBMC kuoppiin, jotta lopullinen konsentraatio oli 1,25 µg/ml (0,25 µg per kuoppa). Solut sekoitettiin jälleen hyvin pipetoimalla ja inkuboitiin 23h (olosuhteissa +37 C°, 5 % CO₂).

Stimulaation viimeisiksi kuudeksi tunniksi kuoppiin pipetoitiin brefeldiini A:ta (Golgiplug™, BD, 555029) ja positiivisen kontrollin kuoppaan PMA/ionomysiinin ja brefeldiinin kaupallista seosta (Leukocyte Activation Cocktail, with BD GolgiPlug™, BD Biosciences, 550583) molempia 1:1000 loppukonsentraatioon. Brefeldiiniä pipetoitiin 2 µl ja PMA/ionomysiiniä 4 µl.

Stimulaation lopuksi solut kerättiin pipetoimalla ja kuopat pestiin hyvin pipetoimalla kasvatusliuosta edestakaisin. Solut kerättiin 2 ml eppendorffputkiin ja pestiin 6,5 min, 400g, +4 C° (Eppendorf centrifuge 5415 R), ennen värjäystä.

3.9 Kateenkorvan solujen stimulaatio

Kateenkorvan solut eristettiin kuten aiemmin kerrottu (Kpl 3.4). Samalla eristettiin potilaan laskimoverinäytteestä PBMC-solut Ficoll-eristyksellä. Eristetyt PBMC-solut siirrettiin tasapohjaisen 96-kuoppalevyn kuoppiin monosyyttien rikastamiseksi niin, että 200 µl tilavuudessa kasvatusliosta oli $0,9 \times 10^6$ solua. Monosyytit voidaan rikastaa perifeerisestä verestä, antamalla niiden tarttua soluviljelykuopan pohjaan. Tämä tapahtui pipetoimalla eristetyt PBMC-solut 96-kuoppalevylle ja inkuboimalla sitä 1-3 h +37, 5% Co₂. Tänä aikana monosyytit aktivoituivat ja tarttuivat kuoppiin kiinni. Irtoisolut pestiin pois PBS:llä. Tällä tavoin voidaan päästä jopa yli 90 % puhtauteen (Wahl, ym. 2006). Monosyyttien päälle pipetoitiin kiinnitettyjä mikrobeja kuten yllä. Monosyyttejä ja mikrobeja inkuboitii tunti soluviljelykaapissa (olosuhteissa +37 C°, 5 % CO₂). Tämän jälkeen kuoppiin pipetoitiin magneettirikastettuja MAIT-soluja yleensä 2:1 suhteessa monosyytteihin. Stimulaatiota jatkettiin kuten yllä mainitussa PBMC-solujen stimulaatiossa (Kpl 3.8)

3.10 Virtaussytometria

Virtaussytometria on menetelmä, jossa soluja tai muita pieniä partikkeleja voidaan laskea tai eritellä valon sironnan ja fluoresenssin avulla, kun ne kulkevat yksitellen kapean putken läpi. Yleensä solut kulkevat nesteessä, niin sanotussa vaippanesteessä (sheath fluid), joka ohjaa ne detektiokammioon. Detektiokammiossa soluihin kohdistetaan lasersäteitä, joiden sirontaa solusta mitataan valomonistusputkilla (photomultiplier tube) (Cossarizza ym. 2017). Tässä tutkimuksessa käytettiin LSRFortessa - laitetta (BD Biosciences)

Valon sirontaa mitataan kahdesta eri suunnasta. Sivusironta (SSC) mittaa solun granulaarisuutta ja pienen kulman sironta (FSC) mittaa solun kokoa. Valosirontaan perustuvan solujen morfologian rajaamisen lisäksi virtaussytometriassa hyödynnetään vasta-aineita. Solut värjätään suoraan fluorokromeilla konjugoiduilla vasta-aineilla, jotka sitoutuvat vastinantigeeniinsa spesifisesti. Tällä tavoin voidaan osoittaa erilaisia solun pinnalla tai sisällä olevia proteiineja. Lisäksi voidaan käyttää sekundääristä värjäystä, jossa mielenkiinnon kohteena oleva epitooppi värjätään vasta-aineella, jossa ei ole fluorokromia. Tämän jälkeen solu värjätään sekundäärisellä toisio-vasta-aineella, joka tarttuu ensimmäiseen vasta-aineeseen. Toisio-vasta-aine on konjugoitu fluorokromilla. Tässä työssä

käytettiin pääosin suoraan fluorokromeilla konjugoituja vasta-aineita, paitsi CD218, joka oli leimattu biotiinilla. Biotiiniin tarttuu voimakkaasti streptavidiini (Weber ym. 1989), joka oli tässä tapauksessa konjugoitu PE-CF594 fluorokromilla.

Fluorokromi on molekyyli, joka eksitoi valoa tietyllä aallonpituudella ja emittoi toisella. Virtaussytometrissä on eri aallonpituuksisia lasereita, joilla voidaan eksitoida (virittää) eri fluorokromeja, jotka sitten emittoivat valoa eri aallonpituuksilla. Emittoitunut valo detektoidaan herkillä valomonistinputkilla (Murphy, ym. 2012).

3.10.1 Vasta-aineet ja MR1-tetrameeri

Fluorokromilla konjugoidut vasta-aineet olivat kaupallisia, paitsi MR1-tetrameeri, joka saatiin lahjoituksena National Institute of Health, Tetramer Core Facility:sta.

MHC:n ja TCR:n keskinäinen sitoutuminen on heikkoa, joten monomeerinen ligandi irtoaa TCR:stä hyvin nopeasti. Tähän ongelmaan on kehitetty MHC-tetrameerit. Tetrameerit koostuvat neljästä MHC-molekyylistä ja niihin sitoutuneesta TCR ligandista, jotka on liitetty yhteen ja konjugoitu fluorokromilla. Neljässä ligandissa on tarpeeksi suuri aviditeetti, jotta sitoutuminen TCR:in on pysyvää (Altman ym. 1996).

MR1-tetrameerissä on neljä yhteenliitettyä ihmisen MR1-molekyyliä, joiden keskellä on 5-OP-RU ligandi. Rakennelma on konjugoitu APC-fluorokromilla. Tämä tetrameeri tarttuu spesifisesti MAIT-solujen (Corbett ym. 2014).

Tässä työssä käytettiin kaupallista kuolleiden solujen värjäystä, jolla voidaan pois sulkea jo kuolleet solut. Kuolleet solut voivat sitoa vasta-aineita epäspesifisesti itseensä ja näin ollen antaa virheellisiä tuloksia. Invitrogenin Live/Dead™ väri tarttuu kuolleiden solujen kalvojen vapaisiin amiineihin, jolloin kuolleet solut fluoresoivat merkittävästi voimakkaammin kuin elävät solut (Anonymi B)

Taulukko 3. Tässä työssä käytetyt fluorokromi konjugoidut vasta-aineet.

Fluoresenssileima	Antigeeni	Valmistaja	Kloon	Katalogi nro.	Laimennussuhde
FITC	CD14	Immunotools	18D11	21620143	1:50
FITC	CD19	Immunotools	HI19a	21810193	1:50
FITC	Live/Dead™	Invitrogen	-	L23101	-
PE	Vα7.2	Biolegend	3610	351706	1:20
PE-CF594	CD218 (IL-18)	Biolegend	H44	313806	1:50
Pe-Cy7	PLZF	eBioscience	9E12	25-9322-82	1:10
APC	hMR1 tetrameeri, 5-OP-RU	NIH	-	35310	1:2500
Alexafluor700	Interferoni-γ	BD	B27	557995	1:100
APC-H7	CD27	Biolegend	O323	302816	1:20
BV421	HELIOS	eBioscience	22F6	48-9883-42	1:20
BV510	CD4	BD	SK3	562970	1:50
BV605	CD161	Biolegend	HP-3610	339916	1:20
BV650	CD8	Biolegend	SK1	344730	1:100
BV711	CD183 (CXCR3)	BD	1C6/CXCR3	503156	1:50
BV786	CD3	BD	SK7	563800	1:25

3.10.2 Solujen värjäys ja permeabilisaatio

Solut värjättiin sekoittamalla pintavärit BD Horizon™ Brilliant värjäyspuskuriin (BD Biosciences) laimennoksissa, jotka oli saatu titraamalla vasta-aineet. Titrauksen avulla käyttölaimeksi oli valittu laimennos, jossa vasta-aineen värjäysintensiteetti ei vielä merkittävästi laske (tehty aiemmin tutkimusryhmässä). Vasta-aineiden määrät kerrottiin tarvittavalla määrällä koesarjan näytteitä (Liite 3). Solut sentrifugoitiin (6 min, 400 g, +4 C°) putken pohjaan ja supernatantti pipetoitiin pois. Näytteet värjättiin 50 µl:n volyymissa pintavärisestä ja inkuboitiin 30 min, +4 C°, pimeässä.

Tämän jälkeen solut pestiin 6 min, 400g, +4 C° (Eppendorf centrifuge 5415 R) ja seuraavaksi permeabilisoitiin.

Pinnaltaan värjätyt solut permeabilisoitiin, jotta transkriptiotekijät ja muut solunsisäiset mielenkiinnon kohteet voitiin värjätä. Solut pestiin ja niiden päälle pipetoitiin 500 µl eBioscience Fixation/Permeabilization (Invitrogen) liuosta. Soluja inkuboitiin 40 min, +4 C°, jonka jälkeen ne pestiin kaksi kertaa 1 ml permeabilisaatiopuskuria (Invitrogen).

Permeabilisaation jälkeen solut värjättiin solulimassa tai tumassa olevien kohdemolekyylien osalta. Valitut vasta-aineet sekoitettiin valitussa laimennossuhteessa, permeabilisaatiopuskuriin ja seosta pipetoitiin 50 µl solujen päälle. Soluja inkuboitiin vasta-aineseoksessa 30 min ajan (olosuhteet +4 C° lämpötilassa ja pimeässä), jonka jälkeen solut pestiin kaksi kertaa 1 ml tilavuudessa permeabilisaatiopuskuria, jonka jälkeen ne sentrifugoitiin 6 ja puolen minuutin ajan (400g, +4 C°, Eppendorf centrifuge 5415 R). Lopuksi solut suspensioitiin 400 – 500 µl tilavuuteen värjäyspuskuria ja analysoitiin virtaussytometrillä.

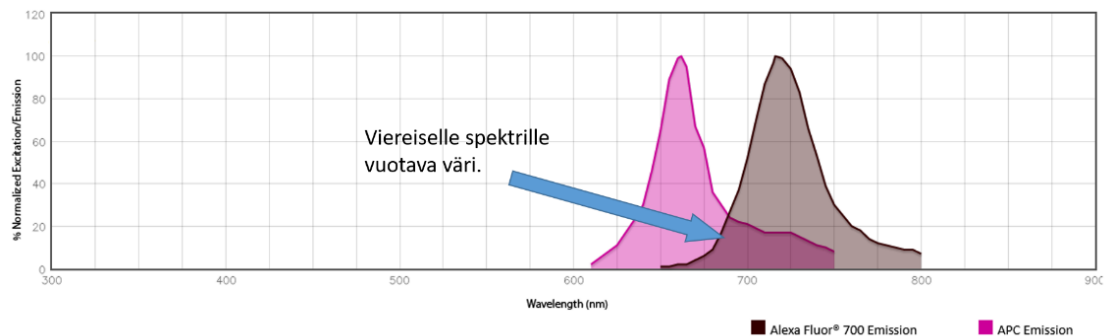
3.11 Kontrollit

3.11.1 Kompensaatiot

Käytössä olleiden fluorokromien emittoiman valon spektrien päällekkäisyys aiheuttaa ongelmia virtaussytometriassa. Kompensatio on prosessi, jossa tietokonealgoritmia hyödyntäen laskennallisesti poistetaan spektrien limittäisyys (Kuva 4). Spektrien limittäisyyden kompensoimiseksi tarvitaan jokaisesta fluorokromista mahdollisimman kirkas yhden fluorokromin signaali, jota verrataan muihin spektreihin. Virtaussytometrin detektorien (fotonin vahvistus putki) voltteja säätämällä, jokainen spektri voidaan saada kirkkaimmaksi omassa aallonpituudessaan. Tämä ei kuitenkaan riitä, sillä pientä vuotoa voi silti esiintyä (Kuva 4). Kun tulokset on tallennettu tietokoneelle, ne voidaan ajaa algoritmien läpi, jotka vähentävät laskennallisesti väärän spektrin vuodon toisesta spektristä (Cossarizza ym. 2017).

Kompensatio toteutettiin värjäämällä polystyreenihelmiä (BD CompBeads, Anti-Mouse Ig, κ, 552843) jotka sitovat epäspesifisesti kaikkia vasta-aineita. Negatiivisena kontrollina käytettiin polystyreenihelmiä, joihin ei tartu mikään vasta-aine. Koeputkeen tiputettiin yksi tippa molempia

helmiä ja lisäksi 1 µl kompensoitavaa vasta-ainetta. Helmiä värjättiin pimeässä 30 min ajan, +4 C°:ssa. Värjäyksen jälkeen helmet pestiin kuten aiemmin (Kpl 3.2). Putket ajettiin Fortessa-virtaussytometrillä kompensatiokontrolliasetuksiin FACS-Diva ohjelmassa.



Kuva 4. Kompensaatiota vaativa spektrien päällekkäisyys, joka johtaisi väärin positiivisiin tuloksiin ilman kompensatiota. Kuvassa APC vuotaa Alexa Fluor 700 päälle ja on kompensoitava pois tuloksista (Kuva muokattu Biolegendin spectra analyzer internetsivulta) (Anonyymi A).

3.11.2 FMO

Fluoresenssi miinus yksi (Fluorescence minus one) eli FMO on kontrolli, jolla kontrolloidaan toisten fluorokromien aiheuttama spektrin leviäminen kohteena olevan fluorokromin detektoriin. Tämä on tärkeä kontrolli, jotta voidaan tarkistaa ja etsiä oikea positiivinen värjäytyminen usean eri fluorokromin paneelista. Kompensaation jälkeen ongelmana on fluorokromin spektrin leviäminen (spread) muiden fluorokromien detektiokanaville. FMO:n tarkoitus on näyttää värjäyspaneelin tausta ilman yhtä, tutkittavaa, fluorokromia (Cossarizza ym. 2017). Tässä tutkimuksessa FMO tehtiin niille fluorokromeille (Liite 4), joille oli muuten hankala saada varmaa rajausta. Värjäykset tehtiin PBMC-soluille.

3.11.3 Isotyypin kontrolli

Isotyypikontrollilla tarkoitetaan vasta-ainetta, jolla on muuten kaikki samat ominaisuudet kuin mitattavalla vasta-aineella, mutta se ei sitoudu spesifiin kohteeseen. Isotyypikontrollilla tulee olla sama tuottoisäntä, vasta-aineluokan ja fluorokromi kontrolloitavan vasta-aineen kanssa.

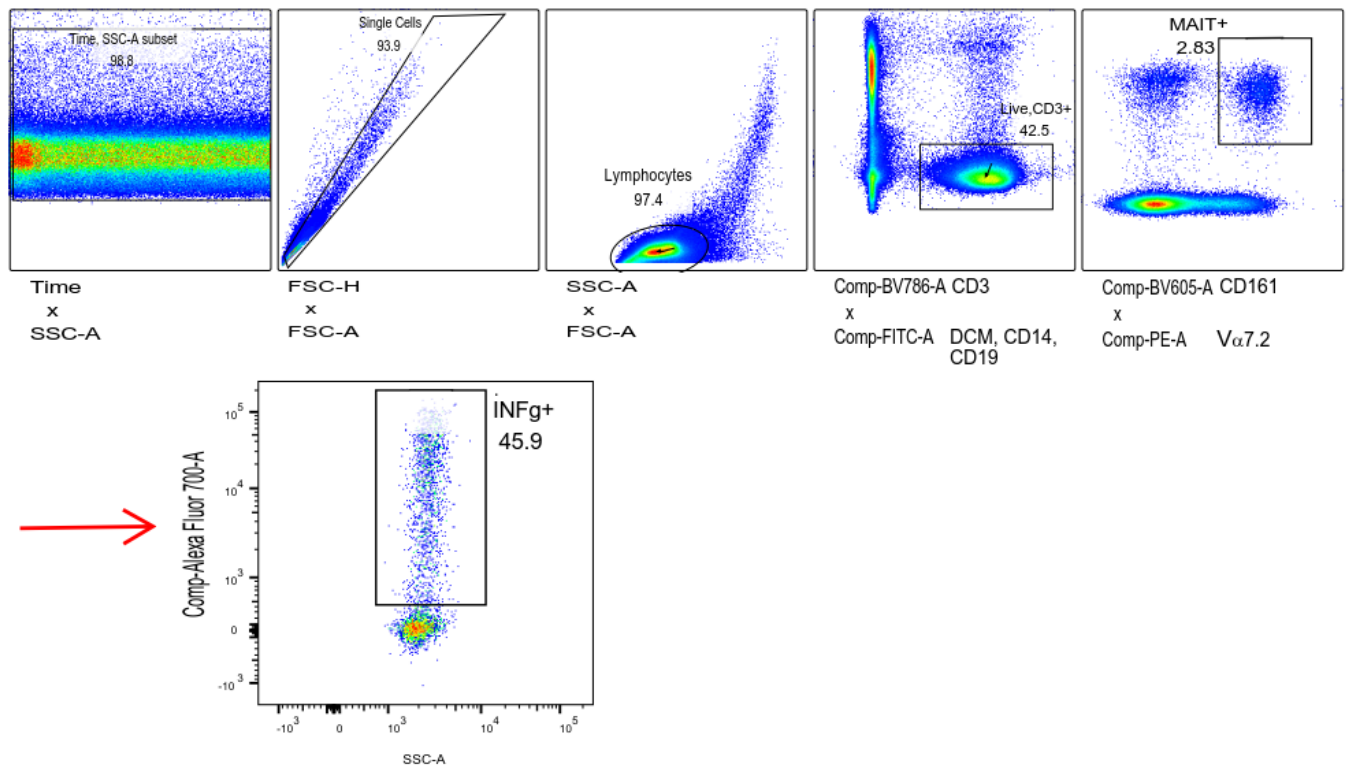
Käyttämällä isotyypikontrollia voidaan saada selville kyseisen vasta-aineen aiheuttama epäspesifinen sitoutuminen kohdesoluihin.

3.11.4 MR1-molekyylin esto soluviljelmässä

Koska MAIT-solut voivat aktivoitua ei-MR1-välitteisesti (Kuva 3.), vaadittiin koesarjaan kontrolli, jolla voitiin osoittaa mikrobistimulaation olevan aidosti MR1-välitteinen. Yhdessä kokeessa *C. albicans* – hiivan stimulaatioista pipetoitiin rinnakkaiset kuopat, joihin lisättiin MR1-molekyyliin estävästi sitoutuvaa vasta-ainetta niin, että sen loppukonsentraatio kuopassa oli 20mg/ml. Anti-MR1 vaikutti tunnin ajan ennen mikrobien lisäystä. Stimulaation jälkeen nämä kuopat pestiin huolellisesti yhden kerran enemmän, jotta ylimääräisestä estävästä vasta-aineesta päästiin eroon. Tämä siksi, että huomasimme reaktioon jääneen ylimääräisen MR1-vasta-aineen estävän MR1-tetrameerivärjäntyvyyden seuraavassa vaiheessa.

3.12 FlowJo analyysiohjelma ja rajausten suunnittelu

LSR Fortessa virtaussytometrillä analysoitujen näytteiden raakadata tallennettiin FCS-tiedostomuodossa ja siirrettiin FlowJo – ohjelmaan (BD) lopullista analysointia varten. Tämän jälkeen tehtiin erilaisia rajauksia eri vasta-aine yhdistelmillä (Kuva 5.). Ensimmäisellä rajauksella (FSC-H, aika) tarkistettiin, että näyte oli ajautunut laadukkaasti virtaussytometriin. Seuraavalla yhdistelmällä (FSC-H, FSC-A) valittiin yksittäiset solut ja poissuljettiin dupletit, eli kahden yhteenliittyneen solun aiheuttamat artefaktat. Tämän jälkeen tehtiin rajaus (FSC-H, SSC-A), jolla valittiin lymfosyytit solupopulaatiosta (Cossarizza ym. 2017). Seuraavasta portista (FITC, CD3) valittiin elävät (FITC negatiiviset) ja CD3-positiiviset solut. Tämän rajauksen ulkopuolelle jäivät myös CD14-positiiviset monosyytit ja CD19-positiiviset B-solut, koska värjäyspaneeliimme kuuluivat vasta-aineet näitä kohtaan ja ne olivat konjugoitu tällä samalla, analyysistä poissuljettavalla fluorokromilla (FITC). Analyysiin hyväksytyt elävät CD3⁺CD19⁻CD14⁻ solut määriteltiin Vα7.2 ja CD161 vasta-aineiden suhteen ja näistä valittiin tuplapositiiiviset- eli MAIT-solut. MAIT-solupopulaatiolle tehtiin loppuanalyysi INF-γ -, HELIOS- ja MR1-värjäysten suhteen. Tulokset muokattiin kuviksi GraphPad Prism 7 – ohjelmalla (GraphPad Software).



Kuva 5. Rajausten suunnittelu FlowJo-ohjelmassa. Ensimmäisenä vasemmalla rajaus ajan mukaan (Time x SSC-A), seuraavana yksittäiset solut (FSC-H, FSC-A) -> lymfosyytit (SSC-A, FSC-A) -> elävät, CD3+ solut (BV786, FITC) -> MAIT-solut CD161+, Va7.2+ (BV605, PE), joista on valittu viimeinen rajaus, Alexafluor700 eli interferoni- γ positiiviset solut. Värät kertovat solutiheydestä, sinisen ollessa harva, muuttuen vihreän ja keltaisen kautta tiheään eli punaiseen.

4. Tulokset

4.1 CFU/ml tulokset

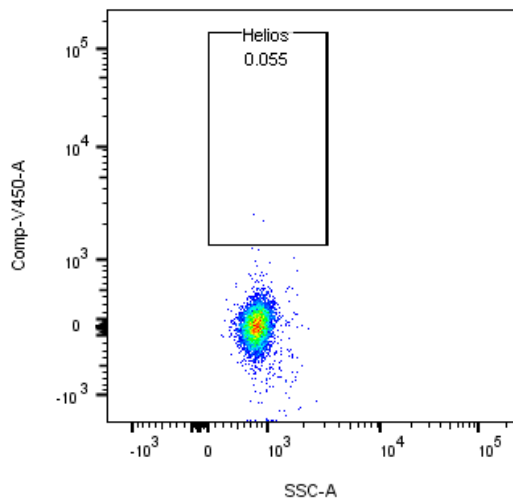
Taulukko 4. CFU/ml laimennosten tulokset, pesäkkeiden lukumäärä per malja.

Laimennos	<i>C.albicans</i>	<i>E.coli</i>	DH5α
10 ⁻⁴	Yli kasvu	Ei tehty	Ei tehty
10 ⁻⁵	1304 pesäkettä	Ei tehty	Ei tehty
10 ⁻⁶	608	Ei tehty	640
10 ⁻⁷	75	336	153
10 ⁻⁸	11	60	24
10 ⁻⁹	0	11	0
10 ⁻¹⁰ - 10 ⁻¹⁴	0	0	0

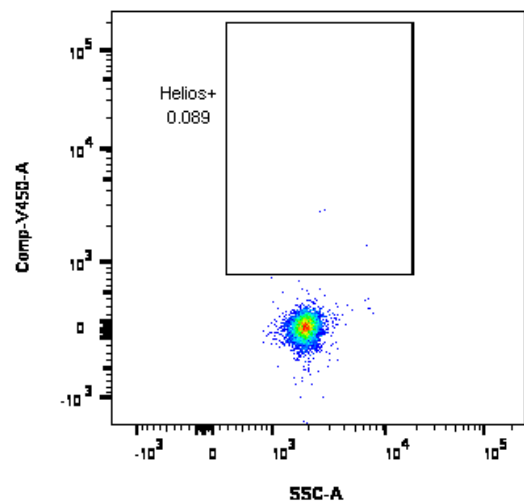
Tuloksista (Taulukko 4.) laskettiin kaavan avulla CFU/ml ja näistä tuloksista keskiarvo, paitsi DH5α, jolta CFU arvo laskettiin 10⁻⁸ tuloksen mukaan. *C.albicans* oli 8,4x10⁹ CFU/ml ja *E.coli* 8,5x10¹⁰. DH5α 2,4x10¹⁰ CFU/ml. CFU/ml arvolla voitiin laskea tarvittavat mikrobimäärät kuhunkin stimulaatioon (Liite 5). Osaa bakteerilaimennoksista ei tehty, sillä ne olisivat oletettavasti kasvaneet liian tiheiksi.

4.2 FMO ja isotyyppikontrolli

Lopulliseen stimulaatiodatan käsittelyyn päädyttiin käyttämään vain HELIOS FMO:ta. Kuvassa 6 näkyy HELIOS rajausta, josta aktivoituneiden MAIT-solujen HELIOS määrä mitattiin. Kuvan PBMC-solut on siis värjätty kaikilla muilla vasta-aineilla, paitsi HELIOS-transkriptiotekijän tunnistavilla. Lisäksi tehtiin HELIOS-isotyyppikontrolli, jolla nähtiin, oliko HELIOS-vasta-aineella epäspesifistä sitoutumista kohde solupopulaatioon (Kuva 7.). FMO-värjäystä olisi voitu myös käyttää tilanteessa, jossa on kahden värin mukaan tehtävä rajausta ja FMO:n avulla varmistua, ettei toisen värin spektri aiheuta väärää positiivista signaalia. Tässä työssä äsken mainitulla tavalla tehtävää rajausta ei kuitenkaan tarvittu.



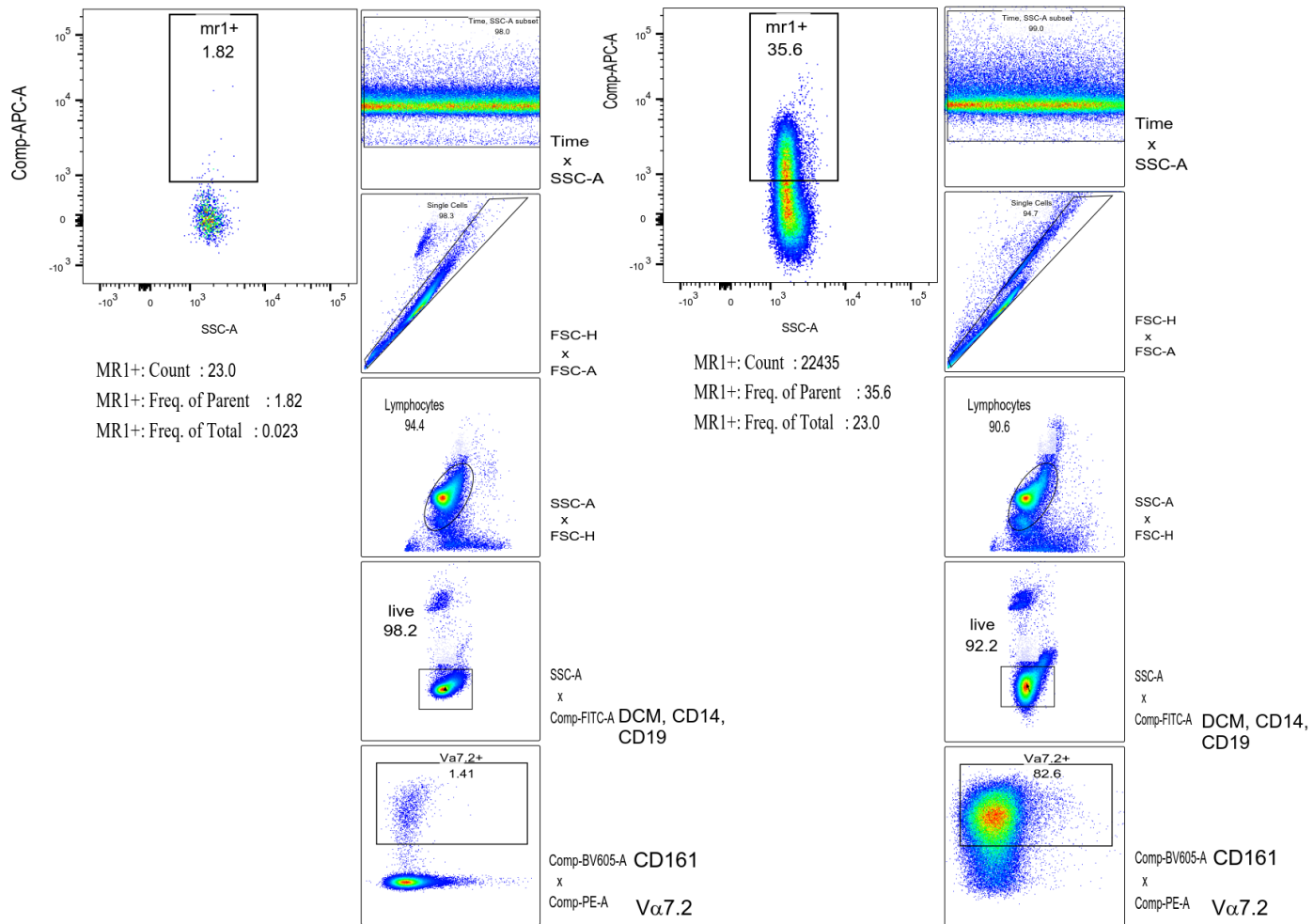
Kuva 6. FMO-rajaus, jonka avulla MAIT-solujen HELIOS-transkriptiotekijän määrä mitattiin.



Kuva 7. Isotyypin vasta-aineella tehty värjäys PBMC-soluille. HELIOS-rajauksesta voidaan nähdä vasta-aineen epäspesifinen sitouminen kohde soluihin, joka on 0,089 %.

4.3 Magneettirikastus

MACS® magneettihelmirikastetut solut ja suoraan kateenkorvasta eristetyt solut värjättiin (Liite 6.) ja näytteet analysoitiin virtaussytometrillä. Kun tuloksia vertailtiin keskenään, nähtiin magneettirikastuksen onnistuneen ja puhtausasteen PE-konjugoidulle V α 7.2 positiivisille soluille olevan yli 80%. Tämän populaation MR1-tetrameeri positiivisten määrä oli noin 35 %, verrattuna suoraan kateenkorvasta eristettyjen solujen vajaaseen kahteen (1,82) prosenttiin (Kuva 8).

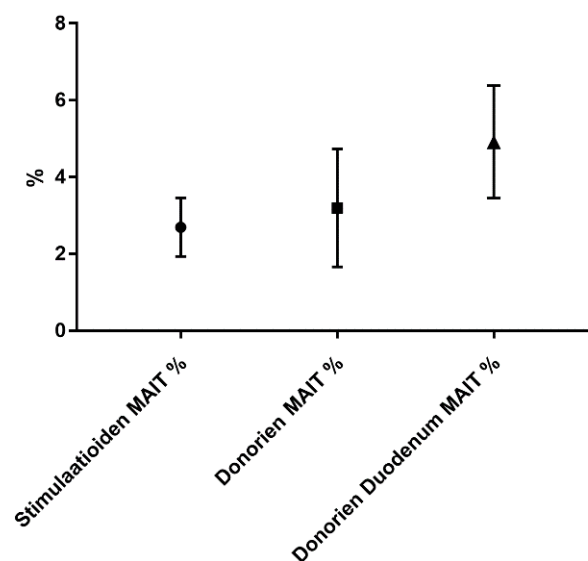


Kuva 8. Magneettihelmieristys kateenkorvan soluille, positiivinen valinta PE-konjugoidulla Va7.2 vasta-aineella. Kuvassa vasemmalla verrokkina suoraan kateenkorvasta eristetyt solut ja oikealla magneettieristetyt. Pienemmissä ruuduissa näkyy rajausten suunnittelu ja isoimpana ruutuna MR1-tetrameerillä värjättyneiden solujen osuus. Rajaukset on suunniteltu samoin kuin kuvassa 5, paitsi elävät solut, joissa ei ole käytetty CD3⁺ rajausta, vaan SSC-A rajausta. Värjit ilmentävät solutiheyttä, sinisen ollessa harva ja keltaisen kautta punaiseen tihtyvä.

4.4 Duodenumin MAIT-solut

Päätimme siirtyä suunnitelman toiseen vaiheeseen kateenkorvasta saatujen tulosten pohjalta ja stimuloida suoraan aikuisten PBMC-soluja ja samalla tutkia paljonko MAIT-soluja on elinluovuttajien veressä ja ohutsuolen alkuosassa eli duodenumissa. Lisäksi tutkittiin, kuinka suuri osa MAIT-soluista on CD4 ja CD8 positiivisia. Dias ym. ovat esittäneet, että CD8⁺ MAIT-solut ovat toiminnallisempia, kuin CD4⁺ tai tuplanegatiiviset MAIT-solut (Dias 2017).

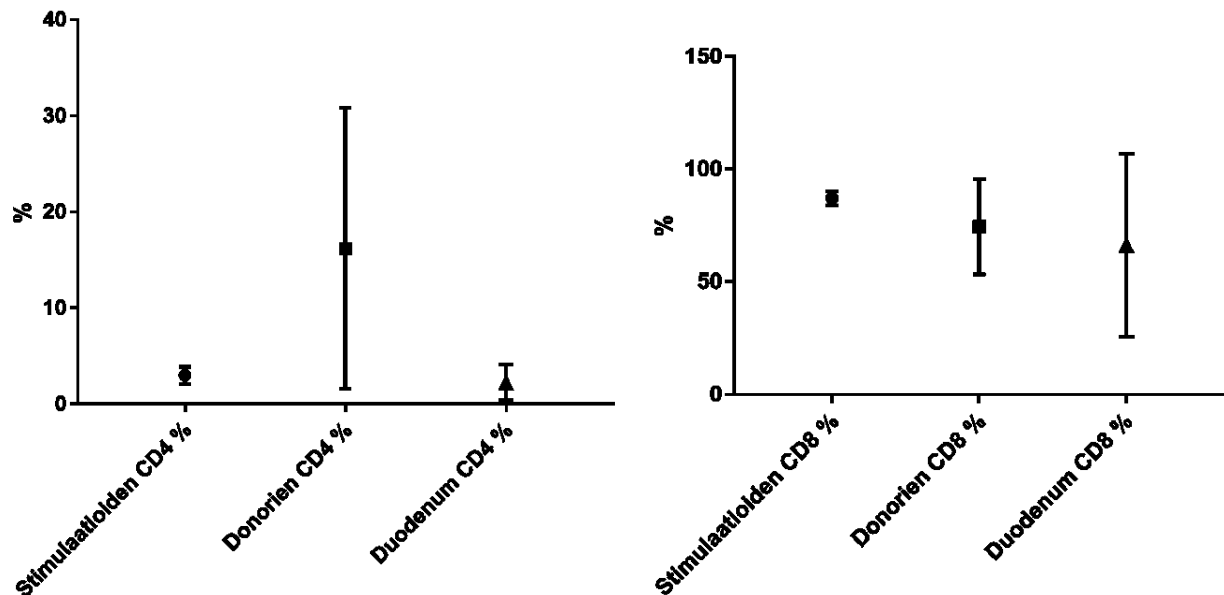
Elinluovuttajien suoli- ja verinäytteitä eristettiin silloin kun niitä oli saatavilla. Eristetyistä soluista tutkittiin MAIT-solujen osuus ja näistä soluista CD4 ja CD8-positiivisten solujen osuus (Kuva 9).



Kuva 9. Stimulaatioissa käytettyjen PBMC-solujen ja elinluovuttajien veren ja duodenumien MAIT-solujen osuus CD3⁺ soluista. Kuvan ”Stimulaatioiden MAIT %” piste kuvaa MAIT-solujen keskiarvoa neljältä eri verenluovuttajalta ennen stimulaatiota ja donorien ja duodenumien pisteet toisilta neljältä eri luovuttajilta laskettua keskiarvoa. Donorit olivat elinluovuttajia ja heiltä tutkittiin sekä veri, että duodenum. Stimulaatioissa käytettyjen veren MAIT keskiarvo on 2,7 % (SD 0,7 %). Donorien veren keskiarvo on 3,2 % (SD 1,5 %) ja duodenumien keskiarvo on 4,9 % (SD 1,5). Stimulaatioiden n=4, donorien n=4.

Elinluovuttajien näytteistä tekemämme eristykset osoittivat MAIT-solujen osuuden duodenumissa olevan aiemmin raportoitua suurempi. Tutkimuksessa vuodelta 2013 Dunne ym. ilmoittivat duodenumin MAIT-solujen määrän olevan 2 %, kun taas meillä vajaa 5 % (Kuva 9). Tosin koehenkilöiden määrä oli suurempi heidän tutkimuksessa (Dunne ym. 2013). CD4⁺ ja CD8⁺ solujen osuudet veressä olivat loogiset, sillä elinluovuttajien keski-ikä oli huomattavasti korkeampi, kuin

stimulaatioissa käytettyjen vapaaehtoisten. Tiedetään, että iän mukana CD4-positiivisten T-solujen suhteellinen osuus veressä lisääntyy, kun CD8-positiivisten lukumäärä laskee (Moro-García ym. 2013). Vaikuttaisi siltä, että sama pätee MAIT-soluihin ja vielä selvemmin se on nähtävissä duodenumissa (Kuvat 10 ja 11). Yhden elinluovuttajan CD4⁺ ja CD8⁺ solujen suhteet olivat hyvin erilaiset kuin muilla (Liite 2). Hänellä oli suurin osa MAIT-soluista tuplanegatiivisia CD4:n ja CD8:n suhteen. Syytä tähän emme saaneet selville, sillä elinluovuttajat tulivat nimettöminä ja taustatieto puuttui.

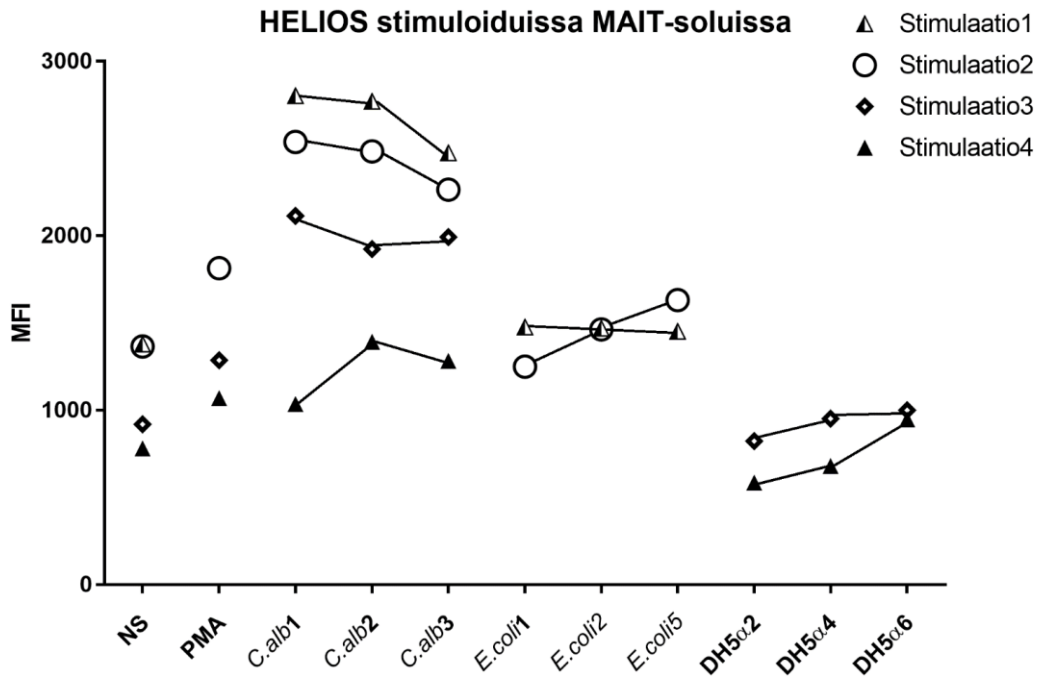


Kuvat 10 ja 11. CD4 ja CD8 positiivisten solujen osuus MAIT-soluista. Kuvissa "Stimulaatioiden" piste kuvaa keskiarvoa neljästä eri PBMC-soluista, joita käytettiin stimulaatiossa. Donorien ja duodenumien pisteet kuvaavat neljältä eri elinluovuttajilta laskettua keskiarvoa. Stimulaatioiden CD4 on 3 % (SD 0,9 %), donorien CD4 on 16,2 % (SD 14,6 %) ja duodenumin 2,2 % (SD 1,8 %). Stimulaatioiden CD8 on 87 % (SD 1,8%), donorien CD8 on 74,5 % (SD 21,13 %) ja duodenumin CD8 on 66,2 % (SD 40,8 %). Stimulaatioiden n=4, donorien n=4

4.5 Stimulaatiot

Ennen kuin siirryimme PBMC solujen stimulaatioon, teimme muutamia kokeita kateenkorvan soluilla. Testien tulokset olivat haastavia tulkita, sillä tutkimuksen kohteena olleet solut ikään kuin ”katosivat” stimulaation jälkeen. Epäilimme, että kateenkorvan solut olivat liian naiiveja stimuloitavaksi ja ne yliaktivoituivat. Yliaktivaatiosta voi seurata joko apoptoosia tai niiden reseptorien vaimennussäätelyä, joita käytimme MAIT-solujen tunnistukseen värjäyksissä.

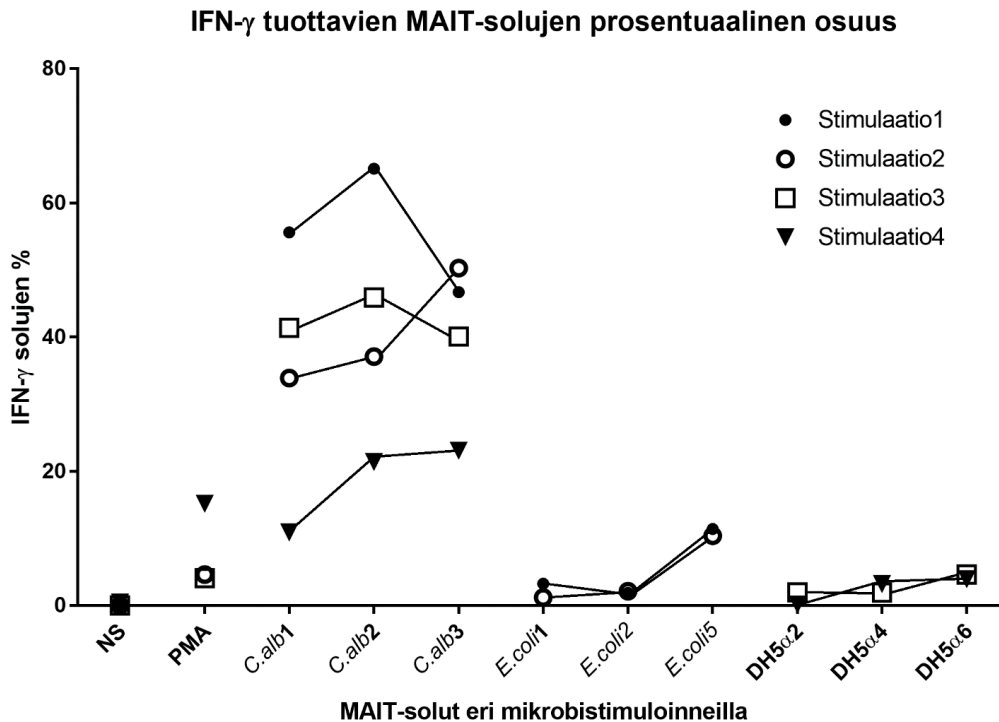
Ensimmäinen stimulaatio PBMC-soluille tehtiin villityypin *C.albicans* –hiivan ja *E.coli* –bakteerin kanssa. Päätimme jättää PMA-kontrollin pois, sillä soluja ei ollut tarpeeksi. MR1-tetrameerivärjäys jäi pois tästä stimulaatiosta aikatauluongelmien vuoksi. Tuloksista kuitenkin näimme, että hiivalla stimuloidut solut antoivat vahvemman signaalin MFI:lla (Mean fluorescence intensity) mitatuttuna sekä INF- γ - että HELIOS-vasta-aineilla, kuin bakteerilla ja päätimme uusia kokeen (Kuvat 12 ja 13). Kuvien Y-akseli edustaa mediaanista fluoresenssin intensiteettiä (MFI). Tässä työssä kaikkiin MFI-arvoihin on valittu mediaani. Tämä siksi, että fluoresenssin intensiteetin keskiarvoon voivat virtausytometriassa vaikuttaa erilaiset tekniset tekijät ja mediaani on siksi luotettavampi (Cossarizza ym. 2017). Ei-stimuloitujen solujen (NS) MFI arvo HELIOS-transkriptiotekijälle oli 1380, *C.albicans* –hiivalla 2804, 2771 ja 2476 ja *E.coli* –bakteerilla 1478, 1470 ja 1453. INF- γ tuottavien solujen osuus NS kontrollille oli 0 %, *C.albicans* –hiivalla 55,6 %, 65,1 % ja 46,7 %. *E.coli* –bakteerilla vastaavat luvut olivat 3,2 %, 1,8 % ja 11,4 %.



Kuva 12. HELIOS MFI stimuloiduissa MAIT-soluissa. Kuvassa on neljä eri stimulaatiokoetta, stimulaatio1-2 on tehty mikrobeilla *C.albicans* (CFU määrillä 1 – 3×10^6) ja *E.coli* (CFU määrillä 1, 2 ja 5×10^6) Stimulaatio3-4 on tehty mikrobeilla *C.albicans* ja DH5α (CFU määrillä 2,4 ja 6×10^6). Ensimmäisessä stimulaatiossa ei ole PMA kontrollia. NS on ei-stimuloidut solut. Y-akselilla on MFI arvot soluista, joihin HELIOS vasta-aine on tarttunut, n=4.

Toisesta stimulaatiosta lähtien mukana oli PMA-kontrolli. Koe tehtiin kuten mainittu kohdassa 3.8 ja tulokset olivat samansuuntaiset kuin ensimmäisessä stimulaatiossa (Kuvat 12 ja 13).

Kirjallisuuden mukaan (Dias ym. 2017) hiivan olisi pitänyt antaa heikompi INF-γ tulos (Kuva 13) kuin bakteerilla, joten päätimme testata toista *E.coli* – kantaa. Valitsimme kolmanteen stimulaatioon DH5α:n, sillä se oli nopeasti saatavilla ja tutkimuksessa vuodelta 2014 Ussher ym. käytti kyseistä kantaa MAIT-solujen aktivaatioon ja raportoi INF-γ tuotannon kasvavan samalla tavalla, kun MAIT-soluja stimuloitiin *E.coli*-bakteerilla tai IL-12 ja IL-18 sytokiineilla. (Ussher ym. 2014). Toisessa stimulaatiossa ei-stimuloitujen solujen (NS) MFI arvo HELIOS-transkriptiotekijälle oli 1366, *C.albicans* –hiivalla tehdyllä stimulaatiolla 2539, 2485 ja 2266 ja *E.coli* –bakteerilla 1251, 1464 ja 1633. PMA – kontrollin arvo oli 1815. INF-γ tuottavien solujen osuus NS kontrollille oli 0 %, PMA – kontrollille 4,6 % ja *C.albicans* –hiivalla 33,9 %, 37,1 % ja 50,3 %. *E.coli* –bakteerilla vastaavat luvut olivat 1,2 %, 2,1 % ja 10,4 %.

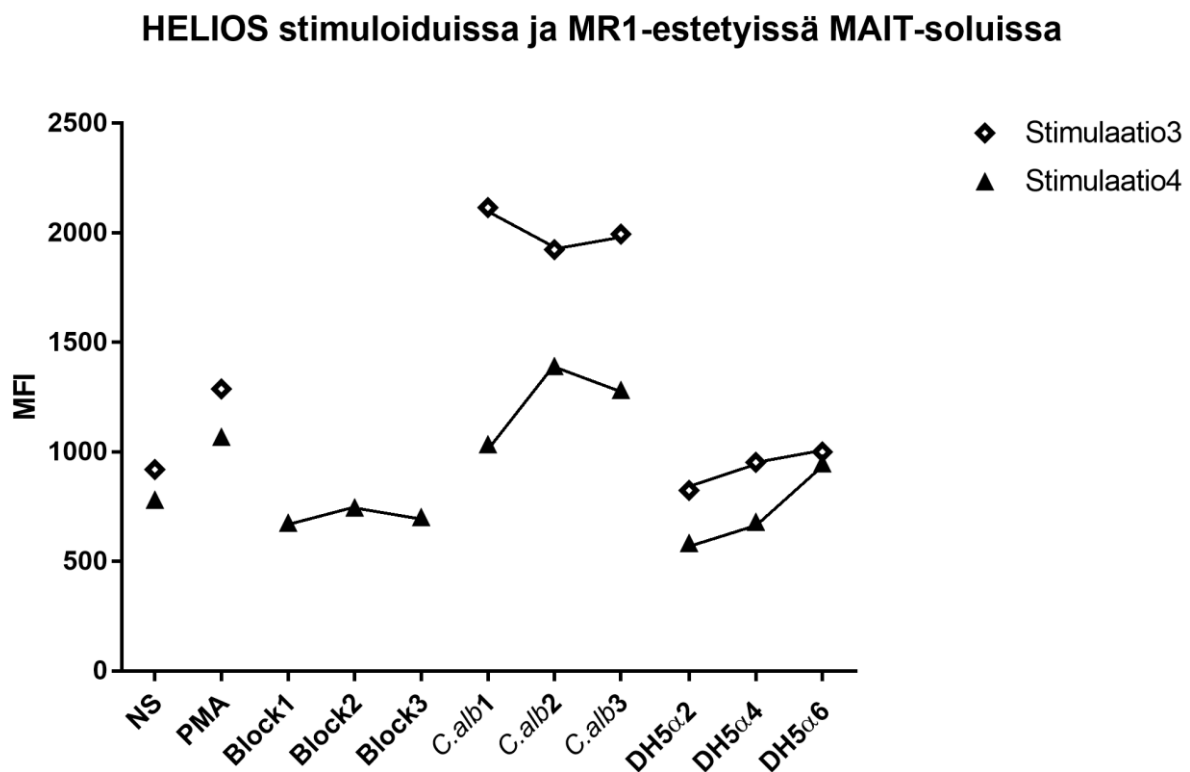


Kuva 13. INF- γ tuottavien MAIT-solujen prosentuaalinen osuus aktivaation jälkeen. Calb1-3 on *C.albicans*-hiivan $1-3 \times 10^6$ CFU-arvoilla tehty aktivaatio ja vastaavasti DH5 α 2-6 on DH5 α -bakteerin $2,4$ ja 6×10^6 CFU määrällä tehty ja *E.coli*1-5 *E.coli*-bakteerin CFU määrällä $1,2$ ja 5×10^6 , n=4.

Kolmannessa stimulaatiossa päätimme lisätä bakteerin CFU määrää. Ajatuksena oli, että suurempi annos voisi nostaa aktivaatiota (Kuvat 12 ja 13). Kokeen tulokset noudattivat samaa suhdetta kuin ennen, bakteeristimulaatiossa oli jopa matalammat tulokset kuin aiemmissä stimulaatioissa. Ei-stimuloitujen solujen (NS) MFI arvo HELIOS-transkriptiotekijälle oli 920, *C.albicans* –hiivalla tehdyllä stimulaatiolla 2115, 1924 ja 1994 ja DH5 α –bakteerilla 824, 952 ja 1000. PMA – kontrollin arvo oli 1281. INF- γ tuottavien solujen osuus NS kontrollille oli 0 %, PMA – kontrollille 4,1 % ja *C.albicans* –hiivalla 41,4 %, 45,9 % ja 40,1 %. DH5 α –bakteerilla vastaavat luvut olivat 1,96 %, 1,91 % ja 4,63 %.

Viimeisessä, neljännessä, stimulaatiossa päätimme testata MR1-molekyylin estoa spesifisellä vasta-aineella (anti-MR1), jotta näkisimme, onko stimulaatio MR1-välitteistä. Valitsimme estokokeeseen *C.albicans* –hiivan, koska sillä oli ollut suurempi aktivaatiovaikutus. Tulos osoitti, että tekemämme stimulaatio aktivoi MAIT-soluja MR1-välitteisesti ja sen, että HELIOS transkriptiotekijän tuotanto liittyy MR1-välitteiseen aktivaatioon (Kuva 14). Ei-stimuloitujen solujen (NS) MFI arvo HELIOS-transkriptiotekijälle oli 782, *C.albicans* –hiivalla tehdyllä stimulaatiolla 1036, 1392 ja 1283 ja DH5 α –bakteerilla 585, 681 ja 948. *C.albicans* – hiivalla

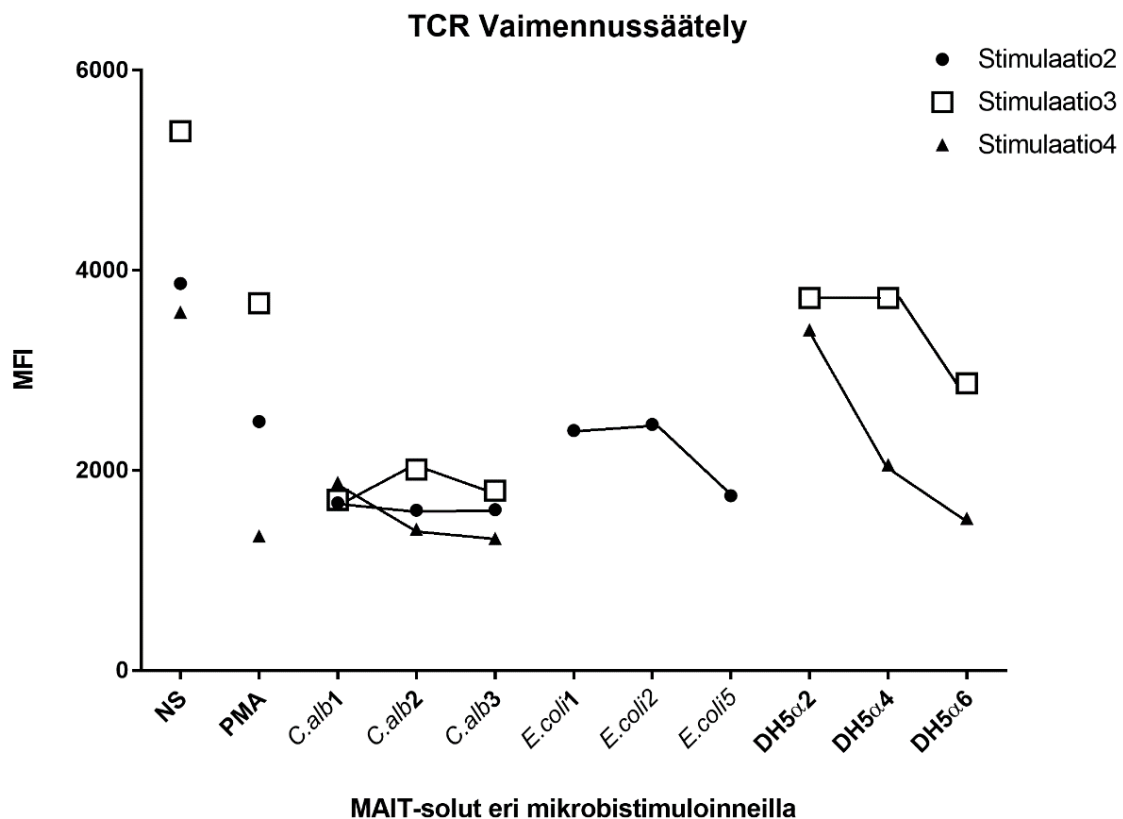
tehtyjen, mutta MR1 estettyjen solujen arvot olivat 677, 747 ja 703. PMA – kontrollin arvo oli 1069. INF- γ tuottavien solujen osuus NS kontrollille oli 0 %, PMA – kontrollille 4,1 % ja *C.albicans* –hiivalla 41,4 %, 45,9 % ja 40,1 %. DH5 α –bakteerilla vastaavat luvut olivat 1,96 %, 1,91 % ja 4,63 %.



Kuva 14. MAIT-solun sisäinen HELIOS-taso aktivaation jälkeen. Block1-3 stimulaatiot on käsitelty anti-MR1-vasta-aineella, joka estää MR1-molekyylin toiminnan. NS on negatiivinen- ja PMA positiivinen kontrolli. DH5 α 2-6 on kolmella eri DH5 α -bakteerin CFU arvolla tehtyt stimulaatiot ja vastaavasti *C.alb1-3* on *C.albicans*-hiivalla tehtyt. Estokokeen n=1, stimulaatio3:n tulokset mukana vertailun vuoksi. Y-akselilla on MFI-arvot soluista, joihin HELIOS-vasta-aine on tarttunut.

INF- γ :n ja HELIOS tuotannon lisäksi aktivaatiota mitattiin MAIT-soluille spesifisen iTCR:n ilmentymisen vähenemisenä, mikä pystyttiin havaitsemaan MR1-tetrameerivärjäyksellä. *C.albicans* –hiivalla stimuloituissa soluissa on yhtä matalat MFI-arvot MR1-tetrameerille kuin PMA aktivoiduissa soluissa. Molemmilla *E.coli* bakteereilla TCR:n vaimennussäätely näkyy laskusuhdanteisena (Kuva 15). Toisessa stimulaatiossa ei-stimuloitujen solujen (NS) MFI arvo MR1-tetrameerille oli 3870, *C.albicans* –hiivalla stimuloituilla 1677, 1603 ja 1609 ja *E.coli* –bakteerilla stimuloituilla 2400, 2461 ja 1748. PMA – kontrollin arvo oli 2490. Kolmannessa stimulaatiossa MFI arvot MR1-tetrameerille ei-stimuloitujen (NS) solujen kohdalla oli 5393,

C.albicans –hiivalla stimuloituilla 1705, 2010 ja 1798 ja DH5 α –bakteerilla stimuloituilla 3723, 3723 ja 2871. PMA –kontrollin arvo oli 3671. Viimeisen eli neljännen stimulaation MR1-tetrameeri MFI arvot olivat ei-stimuloitujen (NS) solujen kohdalla oli 3583, *C.albicans* –hiivalla stimuloituilla 1881, 1413 ja 1320 ja DH5 α –bakteerilla stimuloituilla 3406, 2056 ja 1521. PMA –kontrollin arvo oli 1345.



Kuva 15. MAIT-solujen iTCR vaimennussäätely aktivaatiossa. MAIT-solujen pinnalla olevan TCR:n määrä esitettyinä fluoresoivan MR1-tetrameerin avulla. Stimulaatio1 puuttuu. NS on negatiivinen- ja PMA positiivinen kontrolli. DH5 α 2-6 on kolmella eri DH5 α -bakteerin CFU arvolla tehdyt stimulaatiot ja vastaavasti *C.alb*1-3 on *C.albicans*-hiivalla tehdyt ja *E.coli*1-5 on *E.coli*-bakteerilla. n=3. Y akselilla on MFI arvot soluista, joihin MR1-tetrameeri on tarttunut.

Eri stimulaatiokertojen välillä *C.albicans* –hiivalla stimuloituilla soluilla oli korkeammat HELIOS ja INF- γ MFI-arvot, kuin muilla soluilla tai kontrolleilla. Aktivaatiota arvioitiin INF- γ tuottavien solujen määrällä, joka on kuvattu prosentteina MAIT-soluista (Kuva 13).

PLZF-transkriptiotekijää mitattiin sekä stimuloituista että stimuloimattomista soluista, mutta eroja MFI:ssä ei havaittu näiden solupopulaatioiden kesken.

5. Tulosten yhteenveto ja jatkokokeet

Tämän tutkielman tulokset ovat ensimmäinen osoitus siitä, että MAIT-solujen aktivaation myötä HELIOS-transkriptiotekijän ilmentyminen niissä lisääntyy.

Tuloksista voi nähdä, että *C. albicans* ja *E. coli* aikaansaivat MAIT-soluissa aktivaation, jossa HELIOS-transkriptiotekijää tuotettiin enemmän verrattuna stimuloimattomiin soluihin. Hiivalla tehdyn stimulaation kohdalla tuotanto oli suurempaa. DH5 α -bakteerin kohdalla tuotanto oli hyvin heikkoa, mutta lievä nousujohtoinen suuntaus oli havaittavissa bakteeriannoksen kasvaessa. Tästä voidaan päätellä, että HELIOS-transkriptiotekijän välittämä transkription säätely on tärkeää MAIT-solujen toiminnalle niiden kohdatessa näitä mikrobeja. Selvittämättä vielä jäi, osallistuuko HELIOS myös kateenkorvassa tapahtuvaan MAIT-solulinjan kehittymiseen.

HELIOS tuotannon lisäksi stimulaatioiden aktivaation mittareina käytettiin lisääntyntä interferoni-gamman tuotantoa ja MR1-tetrameerivärjäytymisen vähenemistä eli TCR:n vaimennussäätelyä.

Interferoni- γ tuotannon kasvaminen stimuloituissa soluissa verrattuna ei-stimuloituihin soluihin antaa vahvan viitteen siitä, että MAIT-solut aktivoituivat (Kuva 13). Samoissa soluissa myös HELIOS-transkriptiotekijä ilmentyi korkeammalla tasolla kuin ei-stimuloituissa soluissa (Kuva 12). Aktivaation seurauksena MAIT-solujen iTCR:n ilmentyminen solukalvolla kääntyi laskuun, joka voidaan osoittaa MR1-tetrameerivärjäytymisen vähentymisenä stimuloituissa soluissa (Kuva 15). TCR:n vaimennussäätely on normaali prosessi, joka tapahtuu, kun T-solut aktivoituvat. Ne internalisoivat T-solureseptorinsa valmistautuessaan jakautumaan ja tuottamaan sytokiinejä. TCR:n vaimennussäätely on tärkeää, jotta solu välttää yliaktivaation ja siitä myötä mahdollisesti seuraavan autoimmuunitilan (Gallegos ym. 2016, Valitutti ym. 1995, Krangel 1987).

Tuloksista voidaan myös nähdä, että vaikka *E.coli*-bakteerilla stimuloidut MAIT-solut eivät tuottaneet yhtä suuria määriä IFN- γ :aa, niin TCR-molekyylin vaimennussäätely selkeästi lisääntyi bakteeriannoksen kasvaessa. Hiivalla stimuloituissa soluissa iTCR:n ilmentyminen oli jo matalilla CFU annoksilla alentunutta. Näyttäisi siis siltä, että hiiva sai aikaan maksimaalisen aktivaation jo pienimmällä CFU annoksella, kun taas bakteereilla täyden aktivaation saavuttamiseksi tulisi annosta lisätä.

MR1-estokokeen tuloksista voidaan selkeästi nähdä, että stimulaation aikaansaama aktivaatio on MR1-välitteistä, eikä sytokiinivälitteistä. Tämä oli odotetun kaltainen tulos.

PLZF tekijän muutosta ei havaittu missään kohtaa stimulaatioita. Näyttäisi siltä, että lyhyt mikrobistimulaatio ei vielä vaikuta MAIT-solujen jakautumiseen (Koay ym. 2016), mutta HELIOS-ekspressio nousee ja laskee riippuen mikrobistimulaation laadusta ja määrästä.

Jatkokokeina tullaan suorittamaan pidempi titraussarja bakteeristimulaatioissa. Tarkoituksena on nähdä, aktivoituuko muun muassa IFN- γ :n tuotanto samalle tasolle hiivan kanssa bakteeriannoksen kasvaessa. Lisäksi aiomme värjätä stimuloituja soluja erilaisten aktivaatiomarkkereiden suhteen, jotta voisimme nähdä selkeämmin *E.coli* - bakteereille ominaisen vasteen. Tällaisia ovat muun muassa CD25- ja CD69-reseptorien määrän lisääntyminen solujen pinnalla.

Tarkoituksena on myös tehdä MAIT-solujen *IKZF2*-geenin sammuttaminen siRNA-transfektioilla, tavoitteena nähdä estyykö funktionaalinen kypsyminen stimulaatiossa ja onko geenin sammuttamisella mahdollisia muita vaikutuksia MAIT-solujen toimintaan.

MAIT-solujen esiasteiden tutkiminen kateenkorvassa jäi vielä vajaaksi. Varhaisia vaiheita voisi tutkia käyttäen tetraameerivärjäystä, mutta olisi myös erittäin tärkeää löytää uusia pintareseptoreja osoittamaan varhaisen vaiheen MAIT-solut.

6. Pohdinta

Elimistö kohtaa hyvin erilaisia antigeenejä koko ajan. Tarvitaankin useita T-solujen alapopulaatioita tunnistamaan tämä peptidien, lipidien ja metaboliittien runsas kirjo.

MAIT-solut ovat hyvin runsas T-solupopulaatio ihmiselimistössä ja niiden toiminta ja tarkoitus selventyy koko ajan. Onkin ollut erikoista, että näin pitkälle konservoitunut ja yleinen solupopulaatio on havaittu vasta varsin myöhään immunologiassa.

Kokeideni tulokset eroavat aiemmista Dias ym (Dias ym. 2017) tekemistä kokeista ja ovatkin miltei päinvastaiset. Syitä tähän voi olla useita. Tekemissäni kokeissa oli villityypin *C.albicans* – hiivakanta, joka saattoi vaikuttaa voimakkaammin aktivoitumiseen. Kaikissa aktivaatioissa bakteerit antoivat nousujohteisen IFN- γ :aa tuottavien solujen määrän, joten onkin perusteltua tehdä titraussarja suuremmilla bakteeri CFU – annoksilla. Tuoreessa tutkimuksessa (Hartmann ym. 2018) Hartmann kollegoineen osoitti, että saman *Streptococcus pneumoniae* - serotyypin eri kliiniset isolaatit aiheuttivat eriateisen MAIT-solujen aktivaation, riippuen isolaatin riboflaviini biosynteesin aktiivisuudesta. Hän osoitti myös, että mikrobin kasvatusliuos voi vaikuttaa riboflaviinin tuotantoon. Jos *S. pneumoniae* –bakteeri kasvatettiin liemessä, jossa oli runsaasti riboflaviinia, se ei tuottanut sitä itse ja näin ollen ei myöskään aktivoinut MAIT-soluja. Jos taas liemestä puuttui riboflaviini, oli bakteerin oma tuotanto suurta, kuten MAIT-solujen aktivaatiokin. Olisivatko molemmat itse testaamani *E.coli* – kannat, olleet heikkoja riboflaviinin tuottajia? Tämä voisi selittää matalamman aktivaatiotason kuin hiivalla.

Kun suunnittelimme värjäyspaneelia, emme ajatelleet, etteivät bakteerit aiheuttaisi INF- γ nousua. Tästä syystä paneelista puuttui CD25- ja CD69-vasta-aineet, joiden on näytetty osoittavan bakteeriperäistä aktivaatiota MAIT-soluissa (Le Bourhis ym. 2013). Myöhemmissä kokeissa tulemme lisäämään nämä aktivaatiomarkerit värjäyspaneeliin.

Lähtökohtaisesti kateenkorvan solujen stimulaatio oli korkeamman riskin projekti. Kateenkorvassa on MAIT-soluja erittäin niukalti (0,001 - 0,05 %) ja vaikka joistain kateenkorvista sai eristettyä jopa miljardi solua, ei magneettirikastuskapasiteetti kyennyt aina antamaan tarpeeksi MAIT-soluja. Suurempi ongelma oli lasten laskimoverinäyte, joka tuli kateenkorvan mukana. Sen volyymi oli parhaimmillaankin 500 μ l ja Ficoll eristyksen jälkeen ei PBMC-soluja ja niistä eristettyjä monosyyttejä riittänyt tarpeeksi moneen stimulaatioon. Lopulta virtausytometria tuloksia tarkasteltaessa, ei MAIT-soluja enää kyetty havaitsemaan ja tulimme siihen tulokseen, että epäkypsät MAIT-solut reagoivat liian voimallisesti stimulaatioon ja internalisoivat niiden

tunnistamiseen käyttämiämme pintareseptoreja. On myös mahdollista, että epäkypsät MAIT-solut ajautuivat voimakkaan stimuluksen myötä apoptoosiin.

Vaihteluväli eri stimulaatioissa johtuu luultavasti eri luovuttajien välisistä eroista. Kirjallisuuden mukaan tiedetään, että ihmisillä voi vapaiden MAIT-solujen määrät vaihdella hyvinkin paljon ajankohdasta riippuen (Lee ym. 2014). Saattaa olla, että niiden *ex vivo* aktivaatitasossa voi myös olla vaihtelua.

Ennen viimeistä stimulaatiokoetta virtaussytometrilaitte Fortessalle tehtiin laajempi huolto. Tämä johti laitteen perustason muutoksen, joka saattoi osaltaan muuttaa tuloksia vaikeasti vertailtaviksi keskenään. Rajallinen aika esti uusimasta koetta. Tarkoituksena kuitenkin on jatkaa stimulaatiokokeita kevään 2018 aikana.

Tässä tutkimuksessa osoitettiin ensi kertaa, että HELIOS-transkriptiotekijä on osallisena mikrobien aiheuttamassa MAIT-solujen aktivaatiossa. Se, onko *C.albicans* –hiivalla suurempi vaikutus HELIOS-transkriptiotekijän ilmentymiseen MAIT-soluissa, kuin *E.coli* –bakteereilla, ei voida vielä varmasti sanoa, vaan asia vaatii vielä lisätutkimusta.

7. Kiitokset

Pro gradu-projektini oli loistava oppimiskokonaisuus nykyaikaiseen immunologian tutkimukseen. Tämän työn tekeminen ei olisi ollut mahdollista ilman ohjaajani dosentti Eliisa Kekäläistä. Suuret kiitokset hänelle, kun antoi minulle mahdollisuuden tehdä tiedettä sekä avusta kirjoitusvaiheessa.

Tahtoisin kiittää myös Immunobiologian tutkimusohjelman henkilöstöä, erityisesti Lab Arstilan Nelli Heikkilää, Reetta Vanhasta, Iivo Hetemäkeä, Juho Simolaa ja Tamas Bazinskaa. Nelli neuvoi minua valtavan hienosti projektin alkuvaiheessa: sekä käyttämään Fortessaa, että tulkitsemaan tuloksia FlowJo:ssa. Reetalle kiitos, kun autoit alkuun värjäysten kanssa ja neuvoista tutkimuksen varrella. Kiitos Juha Kotimaalle Seppo Meren laboratoriosta DH5 α -bakteerista ja HUSLAB:n Mykologian osastolle avusta hiivojen kanssa.

Kiitos myös Petteri Arstilalle laitteiden ja tilojen käytöstä.

Ja suuri kiitos Helille ja lapsilleni: Viljamille, Pietarille, Iivarille, Elmiinalle ja Artturille.

Lähteet

Anonyymi A, *BioLegend Spectra Analyzer*, Saatavilla: /global-elements/content-page-for-marketing-site (Haettu 5.3.2018).

Anonyymi B, *LIVE/DEAD Fixable Green Dead Cell Stain Kit, for 488 nm excitation - Thermo Fisher Scientific*, Saatavilla: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/L23101> (Haettu 27.2.2018).

Akimova, T., Beier, U.H., Wang, L., Levine, M.H. & Hancock, W.W. 2011, Helios expression is a marker of T cell activation and proliferation, *PloS one*, **6**(8)

Altman, J.D., Moss, P.A., Goulder, P.J., Barouch, D.H., McHeyzer-Williams, M.G., Bell, J.I., McMichael, A.J. & Davis, M.M. 1996, Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes, *Science (New York, N.Y.)*, **274**(5284), s. 94-96.

Asai, D., Imamura, T., Suenobu, S., Saito, A., Hasegawa, D., Deguchi, T., Hashii, Y., Matsumoto, K., Kawasaki, H., Hori, H., Iguchi, A., Kosaka, Y., Kato, K., Horibe, K., Yumura-Yagi, K., Hara, J. & Oda, M. 2013, IKZF1 deletion is associated with a poor outcome in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia in Japan, *Cancer medicine*, **2**(3), s. 412.

Asanuma, S., Yamagishi, M., Kawanami, K., Nakano, K., Sato-Otsubo, A., Muto, S., Sanada, M., Yamochi, T., Kobayashi, S., Utsunomiya, A., Iwanaga, M., Yamaguchi, K., Uchimar, K., Ogawa, S. & Watanabe, T. 2013, Adult T-cell leukemia cells are characterized by abnormalities of Helios expression that promote T cell growth, *Cancer science*, **104**(8), s. 1097-1106.

Bacher, A., Eberhardt, S., Fischer, M., Kis, K. & Richter, G. 2000, Biosynthesis of vitamin b2 (riboflavin), *Annual review of nutrition*, **20**(1), s. 153-167.

Booth, J.S., Salerno-Goncalves, R., Blanchard, T.G., Patil, S.A., Kader, H.A., Safta, A.M., Morningstar, L.M., Czinn, S.J., Greenwald, B.D. & Sztein, M.B. 2015, Mucosal-Associated Invariant T Cells in the Human Gastric Mucosa and Blood: Role in Helicobacter pylori Infection, *Frontiers in Immunology*, **6**, s. 466.

Corbett, A.J., Eckle, S.B.G., Birkinshaw, R.W., Liu, L., Patel, O., Mahony, J., Chen, Z., Reantragoon, R., Meehan, B., Cao, H., Williamson, N.A., Strugnell, R.A., Sinderen, D.V., Mak, J.Y.W., Fairlie, D.P., Kjer-Nielsen, L., Rossjohn, J. & McCluskey, J. 2014, T-cell activation by transitory neo-antigens derived from distinct microbial pathways, *Nature*, **509**(7500), s. 361.

Cossarizza, A., Chang, H., Radbruch, A., Anä, I., Annunziato, F., Bacher, P., Barnaba, V., Battistini, L., Bauer, W.M., Baumgart, S., Becher, B., Beisker, W., Berek, C., Blanco, A., Borsellino, G., Boulais, P.E., Brinkman, R.R., Büscher, M., Busch, D.H., Bushnell, T.P., Cao, X., Cavani, A., Chattopadhyay, P.K., Cheng, Q., Chow, S., Clerici, M., Cooke, A., Cosma, A., Cosmi, L., Cumano, A., Dang, V.D., Davies, D., de Biasi, S., del Zotto, G., Della Bella, S., Dellabona, P., Deniz, G., Dessing, M., Diefenbach, A., Di Santo, J., Dieli, F., Dolf, A., Donnenberg, V.S., Dörner, T., Ehrhardt, G.R.A., Endl, E., Engel, P., Engelhardt, B., Esser, C., Everts, B., Falk, C.S., Fehniger, T.A., Filby, A., Fillatreau, S., Follo, M., Förster, I., Foster, J., Foulds, G.A., Frenette, P.S., Galbraith, D., Garbi, N., García-Godoy, M.D., Ghoreschi, K., Gibellini, L., Goettlinger, C., Goodyear, C.S., Gori, A., Grogan, J., Gross, M., Grützkau, A., Grummitt, D., Hahn, J., Hammer,

Q., Hauser, A.E., Haviland, D.L., Hedley, D., Herrera, G., Herrmann, M., Hiepe, F., Holland, T., Hombrink, P., Houston, J.P., Hoyer, B.F., Huang, B., Hunter, C.A., Iannone, A., Jäck, H., Jávega, B., Jonjic, S., Juelke, K., Jung, S., Kaiser, T., Kalina, T., Keller, B., Khan, S., Kienhöfer, D., Kroneis, T., Kunkel, D., Kurts, C., Kvistborg, P. & ... 2017, Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies, *European journal of immunology*, **47**(10), s. 1584-1797.

Dias, J., Leeansyah, E. & Sandberg, J.K. 2017, Multiple layers of heterogeneity and subset diversity in human MAIT cell responses to distinct microorganisms and to innate cytokines, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **114**(27).

Dias, J. 2017, *Role of MAIT cells in human antimicrobial immunity*, PhD Thesis. Karolinska Institutet.

Dunne, M.R., Elliott, L., Hussey, S., Mahmud, N., Kelly, J., Doherty, D.G. & Feighery, C.F. 2013, Persistent changes in circulating and intestinal $\gamma\delta$ T cell subsets, invariant natural killer T cells and mucosal-associated invariant T cells in children and adults with coeliac disease, *PloS one*, **8**(10).

Dusseaux, M., Martin, E., Serriari, N., Péguillet, I., Premel, V., Louis, D., Milder, M., Le Bourhis, L., Soudais, C., Treiner, E. & Lantz, O. 2011, Human MAIT cells are xenobiotic-resistant, tissue-targeted, CD161hi IL-17-secreting T cells, *Blood*, **117**(4), s. 1250-1259.

Gallegos, A.M., Xiong, H., Leiner, I.M., Sušac, B., Glickman, M.S., Pamer, E.G. & van Heijst, Jeroen W J 2016, Control of T cell antigen reactivity via programmed TCR downregulation, *Nature Immunology*, **17**(4), s. 379-386.

Georgel, P., Radosavljevic, M., Macquin, C. & Bahram, S. 2011, The non-conventional MHC class I MR1 molecule controls infection by *Klebsiella pneumoniae* in mice, *Molecular Immunology*, **48**(5), s. 769-775.

Ghazarian, L., Caillat-Zucman, S. & Houdouin, V. 2017, Mucosal-associated invariant T cell interactions with commensal and pathogenic bacteria: potential role in antimicrobial immunity in the child, *Frontiers in immunology*, **8**, s. 1837.

Gibbs, A., Leeansyah, E., Introini, A., Paquin-Proulx, D., Hasselrot, K., Andersson, E., Broliden, K., Sandberg, J.K. & Tjernlund, A. 2017, MAIT cells reside in the female genital mucosa and are biased towards IL-17 and IL-22 production in response to bacterial stimulation, *Mucosal Immunology*, **10**(1), s. 35-45.

Gold, M.C., Cerri, S., Smyk-Pearson, S., Cansler, M.E., Vogt, T.M., Delepine, J., Winata, E., Swarbrick, G.M., Chua, W., Yu, Y.Y., Lantz, O., Cook, M.S., Null, M.D., Jacoby, D.B., Harrieff, M.J., Lewinsohn, D.A., Hansen, T.H. & Lewinsohn, D.M. 2010, Human mucosal associated invariant T cells detect bacterially infected cells, *PLoS Biology*, **8**(6).

Guihot, A., Lévy, E., Riteau, B., Meyssonier, V., Duban, L., Dusseaux, M., Froux, N., Huang, S., Lantz, O., Robert, D., Péguillet, I., Soudais, C., Rottman, M., Ngo, C., Premel, V., Coré, M., Martin, E. & Le Bourhis, L. 2010, Antimicrobial activity of mucosal-associated invariant T cells, *Nature Immunology*, **11**(8), s. 701-708.

Hartmann, N., McMurtrey, C., Sorensen, M.L., Huber, M.E., Kurapova, R., Coleman, F.T., Mizgerd, J.P., Hildebrand, W., Kronenberg, M., Lewinsohn, D.M. & Harrieff, M.J. 2018, Riboflavin metabolism variation among clinical isolates of streptococcus pneumoniae results in differential activation of MAIT cells, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*,

Hashimoto, K., Hirai, M. & Kurosawa, Y. 1995, A gene outside the human MHC related to classical HLA class I genes, *Science (New York, N.Y.)*, **269**(5224), s. 693-695.

Heizmann, B., Kastner, P. & Chan, S. 2017, The Ikaros family in lymphocyte development, *Current Opinion in Immunology*, **51**, s. 14-23.

Hernández-Santos, N. & Gaffen, S.L. 2012, Th17 cells in immunity to Candida albicans, *Cell Host & Microbe*, **11**(5), s. 425-435.

Huang, S., Martin, E., Kim, S., Yu, L., Soudais, C., Fremont, D.H., Lantz, O. & Hansen, T.H. 2009, MR1 antigen presentation to mucosal-associated invariant T cells was highly conserved in evolution, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**(20), s. 8290-8295.

Keller, A.N., Eckle, S.B.G., Xu, W., Liu, L., Hughes, V.A., Mak, J.Y.W., Meehan, B.S., Pediongco, T., Birkinshaw, R.W., Chen, Z., Wang, H., D'Souza, C., Kjer-Nielsen, L., Gherardin, N.A., Godfrey, D.I., Kostenko, L., Corbett, A.J., Purcell, A.W., Fairlie, D.P., McCluskey, J. & Rossjohn, J. 2017, Drugs and drug-like molecules can modulate the function of mucosal-associated invariant T cells, *Nature Immunology*, **18**(4), s. 402-411.

Kelley, C.M., Ikeda, T., Koipally, J., Avitahl, N., Wu, L., Georgopoulos, K. & Morgan, B.A. 1998, Helios, a novel dimerization partner of Ikaros expressed in the earliest hematopoietic progenitors, *Current biology : CB*, **8**(9), s. 508-515.

Kim, H., Barnitz, R.A., Kreslavsky, T., Brown, F.D., Moffett, H., Lemieux, M.E., Kaygusuz, Y., Meissner, T., Holderried, T.A.W., Chan, S., Kastner, P., Haining, W.N. & Cantor, H. 2015, Stable inhibitory activity of regulatory T cells requires the transcription factor Helios, *Science (New York, N.Y.)*, **350**(6258), s. 334-339..

Kjer-Nielsen, L. 2012, *MR1-protein*. Saatavilla: <http://www.rcsb.org/structure/4GUP> (Haettu 26.2.2018).

Koay, H.F., Gherardin, N.A., Enders, A., Loh, L., Mackay, L.K., Almeida, C.F., Russ, B.E., Nold-Petry, C.A., Nold, M.F., Bedoui, S., Chen, Z., Corbett, A.J., Eckle, S.B., Meehan, B., d'Udekem, Y., Konstantinov, I.E., Lappas, M., Liu, L., Goodnow, C.C., Fairlie, D.P., Rossjohn, J., Chong, M.M., Kedzierska, K., Berzins, S.P., Belz, G.T., McCluskey, J., Uldrich, A.P., Godfrey, D.I. & Pellicci, D.G. 2016, A three-stage intrathymic development pathway for the mucosal-associated invariant T cell lineage, *Nature immunology*, **17**(11), s. 1300-1311.

Krangel, M.S. 1987, Endocytosis and recycling of the T3-T cell receptor complex. The role of T3 phosphorylation, *The Journal of Experimental Medicine*, **165**(4), s. 1141-1159.

Kumaresan, P.R., Silva, D., Aparecido, T. & Kontoyiannis, D.P. 2018, Methods of controlling invasive fungal infections using CD8+ T cells, *Frontiers in Immunology*, **8**.

Lars Kjer-Nielsen, Onisha Patel, Alexandra J Corbett, Jérôme Le Nours, Bronwyn Meehan, Ligong Liu, Mugdha Bhati, Zhenjun Chen, Lyudmila Kostenko, Rangsimma Reantragoon, Nicholas A Williamson, Anthony W Purcell, Nadine L Dudek, Malcolm J McConville, Richard A J O'Hair, George N Khairallah, Dale I Godfrey, David P Fairlie, Jamie Rossjohn & James McCluskey 2012, MR1 presents microbial vitamin B metabolites to MAIT cells, *Nature*, **491**(7426), s. 717.

Le Bourhis, L., Dusseaux, M., Bohineust, A., Bessoles, S., Martin, E., Premel, V., Coré, M., Sleurs, D., Serriari, N., Treiner, E., Hivroz, C., Sansonetti, P., Gougeon, M., Soudais, C. & Lantz, O. 2013, MAIT cells detect and efficiently lyse bacterially-infected epithelial cells, *PLoS pathogens*, **9**(10),

Le Bourhis, L., Guerri, L., Dusseaux, M., Martin, E., Soudais, C. & Lantz, O. 2011, Mucosal-associated invariant T cells: unconventional development and function, *Trends in Immunology*, **32**(5), s. 212-218.

Lee, O.-., Cho, Y., Kee, S., Kim, M., Jin, H., Lee, S., Park, K., Kim, T., Lee, S., Kwon, Y., Kim, N., Shin, M., Shin, J., Suh, S., Ryang, D. & Park, Y. 2014, Circulating mucosal-associated invariant T cell levels and their cytokine levels in healthy adults, *Experimental Gerontology*, **49**, s. 47-54.

Leung, D.T., Bhuiyan, T.R., Nishat, N.S., Hoq, M.R., Aktar, A., Rahman, M.A., Uddin, T., Khan, A.I., Chowdhury, F., Charles, R.C., Harris, J.B., Calderwood, S.B., Qadri, F. & Ryan, E.T. 2014, Circulating mucosal associated invariant T cells are activated in *Vibrio cholerae* O1 infection and associated with lipopolysaccharide antibody responses, *PLoS neglected tropical diseases*, **8**(8).

Martin, E., Treiner, E., Duban, L., Guerri, L., Laude, H., Toly, C., Premel, V., Devys, A., Moura, I.C., Tilloy, F., Cherif, S., Vera, G., Latour, S., Soudais, C. & Lantz, O. 2009, Stepwise development of MAIT cells in mouse and human, *PLoS Biology*, **7**(3), s. 525.

Moro-García, M.A., Alonso-Arias, R. & López-Larrea, C. 2013, When aging reaches CD4+ T-cells: Phenotypic and Functional Changes, *Frontiers in immunology*, **4**, s. 107.

Murphy, Kenneth, Travers, Paul., Walport, Mark., Janeway, Charles., 2012, *Janeway's immunobiology*, Garland Science, New York.

Patel, O., Kjer-Nielsen, L., Nours, J.L., Eckle, S.B.G., Birkinshaw, R., Beddoe, T., Corbett, A.J., Liu, L., Miles, J.J., Meehan, B., Reantragoon, R., Sandoval-Romero, M.L., Sullivan, L.C., Brooks, A.G., Chen, Z., Fairlie, D.P., McCluskey, J. & Rossjohn, J. 2013, Recognition of vitamin B metabolites by mucosal-associated invariant T cells, *Nature Communications*, **4**, s. 2142.

Porcelli, S., Yockey, C.E., Brenner, M.B. & Balk, S.P. 1993, Analysis of T cell antigen receptor (TCR) expression by human peripheral blood CD4-8- alpha/beta T cells demonstrates preferential use of several V beta genes and an invariant TCR alpha chain, *The Journal of Experimental Medicine*, **178**(1), s. 1-16.

Riepert, P., Wanner, V. & Bahram, S. 1998, Genomics, isoforms, expression, and phylogeny of the MHC class I-related MR1 gene, *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, **161**(8), s. 4066-4077.

Sakala, I.G., Kjer-Nielsen, L., Eickhoff, C.S., Wang, X., Blazevic, A., Liu, L., Fairlie, D.P., Rossjohn, J., McCluskey, J., Fremont, D.H., Hansen, T.H. & Hoft, D.F. 2015, Functional heterogeneity and anti-mycobacterial effects of mouse mucosal associated invariant T (MAIT) cells specific for riboflavin metabolites(), *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, **195**(2), s. 587-601.

Sander, B., Andersson, J. & Andersson, U. 1991, Assessment of cytokines by immunofluorescence and the paraformaldehyde-saponin procedure, *Immunological Reviews*, **119**, s. 65-93.

Seach, N., Guerri, L., Le Bourhis, L., Mburu, Y., Cui, Y., Bessoles, S., Soudais, C. & Lantz, O. 2013, Double-positive thymocytes select mucosal-associated invariant T cells, *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, **191**(12), s. 6002-6009.

Smith, D.J., Hill, G.R., Bell, S.C. & Reid, D.W. 2014, Reduced mucosal associated invariant T-cells are associated with increased disease severity and *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis, *PloS one*, **9**(10), s. e109891.

Thornton, A.M., Korty, P.E., Tran, D.Q., Wohlfert, E.A., Murray, P.E., Belkaid, Y. & Shevach, E.M. 2010, Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3⁺ T regulatory cells, *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, **184**(7), s. 3433-3441.

Treiner, E., Duban, L., Bahram, S., Radosavljevic, M., Wanner, V., Tilloy, F., Affaticati, P., Gilfillan, S. & Lantz, O. 2003, Selection of evolutionarily conserved mucosal-associated invariant T cells by MR1, *Nature*, **422**(6928), s. 164-169.

Ussher, J.E., Bilton, M., Attwod, E., Shadwell, J., Richardson, R., de Lara, C., Mettke, E., Kurioka, A., Hansen, T.H., Klenerman, P. & Willberg, C.B. 2014, CD161⁺⁺ CD8⁺ T cells, including the MAIT cell subset, are specifically activated by IL-12+IL-18 in a TCR-independent manner, *European Journal of Immunology*, **44**(1), s. 195-203.

Valitutti, S., Müller, S., Cella, M., Padovan, E. & Lanzavecchia, A. 1995, Serial triggering of many T-cell receptors by a few peptide-MHC complexes, *Nature*, **375**(6527), s. 148-151.

Wahl, L.M., Wahl, S.M., Smythies, L.E. & Smith, P.D. 2006, Isolation of human monocyte populations, *Current Protocols in Immunology*, **Chapter 7**, s. Unit 7.6A.

Weber, P.C., Ohlendorf, D.H., Wendoloski, J.J. & Salemme, F.R. 1989, Structural origins of high-affinity biotin binding to streptavidin, *Science (New York, N.Y.)*, **243**(4887), s. 85-88.

Yoshida, T. & Georgopoulos, K. 2014, Ikaros fingers on lymphocyte differentiation, *International Journal of Hematology*, **100**(3), s. 220-229.

Zhao, S., Liu, W., Li, Y., Liu, P., Li, S., Dou, D., Wang, Y., Yang, R., Xiang, R. & Liu, F. 2016, Alternative Splice Variants Modulates Dominant-Negative Function of Helios in T-Cell Leukemia, *PloS One*, **11**(9), s. e0163328.

Liitteet

Liite 1.

Puskurit:

Värjäyspuskuri (500ml)

2ml 2 mM EDTA + 10 ml FCS + 488 ml PBS

MACS-puskuri (500 ml)

2 ml 2mM EDTA + 2,5 ml FCS + 496,5 ml PBS.

Elatusaineet:

Sabouraud Glukoosi malja

Sabouraud Dextrose Agar (LAB M, LAB009) 62 g + dihydrostreptomycin sesquisulfaatti (Sigma, D7253) 26 mg + Geopenil 606 mg (Orion, 465054) 48 mg, ad 1000 ml tislattu vesi. pH 5,5 – 5,9

LB-liemi

LB Broth, Lennox (BD Difco, 240230) 20 g + glukoosi (VWR/BDH, 101176K) 1 g, ad 1000 ml tislattu vesi.

Humaanikasvatusliuos (15ml)

1,5 ml humaani AB seerumia (Sigma, H3667)

150 µl 100x penicillin-streptomycin glutamiini (glutamiini 29,2 mg/ml) (Gibco 10378-016)

150 µl 1M HEPES (Sigma, H0887)

15 µl MeEtOH (Gibco Cat.No:31350-010)

ad 15 ml RPMI (Lonza, Biowhittaker®, BE12-167F)

Liite 2.

	MAIT %	CD4+ MAIT	CD8+ MAIT	
Stimulaatio1	2,79 %	3,23 %	89,00 %	
Stimulaatio2	3,05 %	2,65 %	90,60 %	
Stimulaatio3	1,60 %	4,12 %	84,60 %	
Stimulaatio4	3,34 %	1,96 %	84,00 %	
Donor 1 PBMC	3,68 %	19,80 %	52,20 %	
Donor 2 PBMC	5,00 %	0,28 %	99,20 %	
Donor 3 PBMC	1,35 %	34,60 %	62,50 %	
Donor 4 PBMC	2,76 %	10,10 %	83,90 %	
Donor 1 Duodenum	5,81 %	4,76 %	83,20 %	
Donor 2 Duodenum	5,26 %	2,26 %	6,59 %	(DN 88,2 %)
Donor 3 Duodenum	2,75 %	1,40 %	76,30 %	
Donor 4 Duodenum	5,83 %	0,52 %	98,60 %	

Liite 3. Värjäystaulukko, jolla tarvittava määrä vasta-aineita ja värjäyspuskuria laskettiin.

Värjäyspohja

Näytteiden lukumäärä sis. pipetoimisvaran keltaiseen B3 soluun

9

		Pintavärit	ul / 50 ul	PIPETOI	Sekund. Ab	ul / 50 ul	PIPETOI	Intravärit	ul / 50 ul	PIPETOI
488nm	FITC	CD14	1	9	DCM		1			0
	FITC	Cd19	1	9			0			0
	FITC			0			0			0
	PE	Valpha7.2	2,5	22,5			0			0
	PE-CF594 / TxRed / ECD	CD218	1	9	pe-cf594	2,5	22,5			0
	PerCP-Cy5.5			0			0	Ki67	2,5	22,5
	Pe-Cy7			0			0	PLZF	5	45
640nm	APC	MR1 tetrameeri		0			0			0
	AlexaFluor700			0			0	IFN-gamma	0,5	4,5
	APC-H7	CD27	2,5	22,5			0			0
405nm	BV421			0			0	HELIOS	2,5	22,5
	BV510	CD4	1	9			0			0
	BV605	CD161	2,5	22,5			0			0
	BV650	CD8	0,5	4,5			0			0
	BV711	CD183 (cxcr3)	1	9			0			0
	BV786	CD3	2	18			0			0
STAINING BUFFER			35	315		47,5	427,5		39,5	355,5

Liite 4.

FMO kontrollin värjäyssuunnitelma. +merkki tarkoittaa fluorokromin sisällyttämistä värjäykseen ja -merkki tarkoittaa sen pois jättämistä.

	CD14/C D19	Va 7.2	CD21 8	Ki67	PL ZF	tetra- meeri	IFN- gamma	CD27	HELI OS	CD4	CD1 61	CD8	CXC R3	CD3
	FITC	PE	PE- cf594	Per- Cy5.5	PeC y7	APC	AlexaFluo r-700	APC- H7	BV42 1	BV5 10	BV6 05	BV6 50	BV7 11	BV7 86
Un stained	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ki67	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PLZF	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Helios	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Cxcr3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Fully stained	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Liite 5. CFU määrien laskut stimulaatioissa

E.coli

$8,5 \times 10^{10}$ CFU/ml \rightarrow laimennos 1:100 (1 ml) \rightarrow $8,5 \times 10^8$ CFU/ml Pipetoitiin 588 μ l CellFIX liuokseen, jolloin 5×10^8 CFU. Näistä kiinnitetyistä mikrobeista pipetoitiin tarvittava määrä, jotta saatiin haluttu CFU arvo:

CellFIX kiinnitetyt mikrobit	Humaanimedia	CFU arvo
2 μ l	8 μ l	1×10^6 CFU/10 μ l
4 μ l	6 μ l	2×10^6 CFU/10 μ l
10 μ l		5×10^6 CFU/10 μ l

DH5a

$2,4 \times 10^{10}$ CFU/ml \rightarrow laimennos 1:10 (1 ml) \rightarrow 24×10^8 CFU/ml Pipetoitiin 210 μ l CellFIX liuokseen, jolloin 5×10^8 CFU. Näistä kiinnitetyistä mikrobeista pipetoitiin tarvittava määrä, jotta saatiin haluttu CFU arvo:

CellFIX kiinnitetyt mikrobit	Humaanimedia	CFU arvo
4 μ l	6 μ l	2×10^6 CFU/10 μ l
8 μ l	2 μ l	4×10^6 CFU/10 μ l
12 μ l		6×10^6 CFU/12 μ l

C.alb

8,4x10⁹ CFU/ml -> laimennos 1:10 (1 ml) -> 8,4x10⁸ CFU/ml. Pipetoitiin 588 µl CellFIX liuokseen, jolloin 5x10⁸ CFU. Näistä kiinnitetyistä mikrobeista pipetoitiin tarvittava määrä, jotta saatiin haluttu CFU arvo:

CellFIX kiinnitetyt mikrobit	Humaanimedia	CFU arvo
2 µl	8 µl	1x10 ⁶ CFU/10 µl
4 µl	6 µl	2x10 ⁶ CFU/10 µl
6 µl	4 µl	3x10 ⁶ CFU/10 µl

Liite 6.

Pikkupaneelivärjäys kateenkorvan magneettirikastukselle

FITC	CD14
FITC	CD19
FITC	DCM
PE	Vα7.2
BV510	CD4
BV605	CD161
BV650	CD8
BV786	CD3